



Sveučilište u Zagrebu
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Maja Bival Štefan

**BIOLOŠKI UČINCI FENOLNIH KISELINA IZ
ODABRANIH VRSTA PORODICE
LAMIACEAE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



University of Zagreb
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Maja Bival Štefan

BIOLOGICAL EFFECTS OF PHENOLIC ACIDS FROM SELECTED LAMIACEAE SPECIES

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015.



Sveučilište u Zagrebu
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Maja Bival Štefan

**BIOLOŠKI UČINCI FENOLNIH KISELINA IZ
ODABRANIH VRSTA PORODICE
LAMIACEAE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević

Zagreb, 2015.



Sveučilište u Zagrebu
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Maja Bival Štefan

BIOLOGICAL EFFECTS OF PHENOLIC ACIDS FROM SELECTED LAMIACEAE SPECIES

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. Sanda Vladimir-Knežević, Ph. D.

Zagreb, 2015.

Doktorski rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Zavodu za Farmakognozu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u suradnji sa Zavodom za mikrobiologiju i Zavodom za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, GlaxoSmithKline istraživačkim centrom u Zagrebu te Institut für Pharmazeutische Wissenschaften-Pharmakognosie Karl-Franzens Universität Graz (Austrija), u sklopu dokorskog sudija „Farmaceutske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u okviru projekta MZOŠ-a ”Bioaktivne prirodne tvari: izolacija, karakterizacija i biološki učinci“ (006-0061117-1238).

Zahvaljujem se

mentorici prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević na nesebičnim savjetima, strpljenju te velikoj pomoći i podršci tijekom izrade ovog doktorskog rada;

prof. dr. sc. Franzu Bucaru na pomoći tijekom fitokemijskih istraživanja u sklopu istraživačkog boravka na Institut für Pharmazeutische Wissenschaften-Pharmakognosie, Karl-Franzens Universität Graz;

dr. sc. Dubravku Jeliću i ostalim zaposlenicima Istraživačkog centra GlaxoSmithKline (danas Fidelia d.o.o.) u Zagrebu koji su doprinijeli istraživanju citotoksičnog i protuupalnog učinka u okviru doktorskog rada;

dr. sc. Nevenki Kopjar s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada i izv. prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić sa Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na suradnji i pomoći prilikom izvođenja kometa testa;

izv. prof. dr. sc. Jadranki Vuković Rodríguez sa Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na suradnji i pomoći pri prevalidaciji spektrofotometrijskih metoda;

svim suradnicima u Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, posebice Biljani i Mariji, na velikoj podršci i nesebičnoj pomoći tijekom izrade doktorskog rada.

Najveća hvala mojoj obitelji za sve što su napravili za mene uz veliku ispriku jednoj malojoj mišici što me često nije bilo kod kuće...

U okviru ovog doktorskog rada po prvi put je provedeno opsežno usporedno istraživanje bioloških učinaka 14 prirodnih fenolnih kiselina, prevalidacija metode određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata u biljnim drogama, fitokemijska karakterizacija fenolnih kiselina i flavonoida te biološki učinci odabranih vrsta roda *Micromeria* Bentham (Lamiaceae).

Antioksidacijski učinak fenolnih kiselina ispitan je primjenom četiri različite spektrofotometrijske metode. Hidroksicimetne kiseline su pokazale bolja antioksidacijska svojstva u odnosu na većinu hidroksibenzojevih kiselina, a iznimno dobar antioksidacijski učinak utvrđen je za ružmarinsku, kavenu i galnu kiselinu. Citotoksični učinak fenolnih kiselina ispitan je na HepG2 i THP 1 staničnim kulturama primjenom MTS testa, pri čemu većina testiranih kiselina nije pokazala značajnije smanjenje vijabilnosti stanica. Istraživanje protuupalnog djelovanja fenolnih kiselina istaknulo je galnu, ružmarinsku, klorogensku, kavenu i sinapinsku kiselinu kao dobre inhibitore interleukina-6. Komet testom na uzorku humane krvi nakon tretiranja bovericinom, dokazan je dobar antigenotoksični učinak svih ispitanih fenolnih kiselina.

Fitokemijska analiza fenolnih kiselina i flavonoida u biljnim vrstama porodice Lamiaceae provedena je primjenom kromatografskih (HPTLC, RP-HPLC-DAD, LC-ESI-MS/MS) i spektrofotometrijskih metoda. U etanolnim ekstraktima vrsta *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* identificirano je jedanaest fenolnih kiselina i petnaest flavonoida. Kriptoklorogenska, neoklorogenska, 3-*p*- i 4-*p*-kumaroilkina, 3-(3,4- dihidroksifenil)mliječna, salvianolna kiselina B i J te dimer i trimer ružmarinske kiseline po prvi put su identificirane u navedenim vrstama. Izuzev luteolinskih i akacetinskih derivata u vrstama *M. juliana* i *M. thymifolia*, ostali su flavonoidi također prvi put identificirani u ispitivanim vrstama roda *Micromeria*. Ustanovljena su dobra antioksidacijska, protuupalna i antigenotoksična svojstva odabranih biljnih vrsta, pri čemu se istaknula endemična vrsta *M. croatica*.

Dobiveni rezultati ukazali su na veliki biomedicinski potencijal ispitanih fenolnih kiselina i vrsta roda *Micromeria*.

Ključne riječi: fenolne kiseline, flavonoidi, *Micromeria*, antioksidacijski učinak, citotoksični učinak, protuupalni učinak, IL-6, antigenotoksični učinak

A comprehensive comparative study of the biological effects of 14 natural phenolic acids, prevalidation of total hydroxycinnamic assays, identification of phenolic acids and flavonoids as well as biological activities of selected *Micromeria* species were conducted for the first time in this doctoral thesis.

Antioxidant activity of phenolic acids was tested using four different spectrophotometric methods. Hydroxycinnamic acids had better antioxidant properties than most hydroxybenzoic acids. Evaluation of antioxidant activity highlighted rosmarinic, caffeic and gallic acids as the best ones. Cytotoxic effect of phenolic acids was studied on HepG2 and THP-1 cell cultures using MTS test, and phenolic acids did not show significant reduction of cell viability. Investigation of phenolic acids' anti-inflammatory activity revealed gallic, rosmarinic, chlorogenic, caffeic and sinapinic acids as good inhibitors of interleukin-6 production. Comet assay on human blood cells treated with beauvericin proved good antigenotoxic effects of all tested phenolic acids.

Phytochemical analysis of polyphenols was carried out using various chromatographic (HPTLC, RP-HPLC-DAD, LC-ESI-MS/MS) and spectrophotometric methods. Eleven phenolic acids and fifteen flavonoids were identified in the ethanolic extracts of *M. croatica*, *M. juliana* and *M. thymifolia*. Chriptochlorogenic, neochlorogenic, 3-*p*- and 4-*p*-coumaroylquinic, 3-(3,4- dihydroxyphenyl)lactic, salvianolic acid B and J as well as dimer and trimer of rosmarinic acid were identified in these species for the first time. With exception of luteolin and acacetin derivatives in *M. juliana* and *M. thymifolia*, flavonoids were identified for the first time in the tested species. Good antioxidant, anti-inflammatory and antigenotoxic properties were established for investigated *Micromeria* species with special emphasis on endemic *M. croatica*.

Obtained results revealed the great biomedical potential of tested phenolic acids and *Micromeria* species.

Keywords: phenolic acids, flavonoids, *Micromeria*, , antioxidant effect, cytotoxic effect, anti-inflammatory effect, IL-6, antigenotoxic effect

S A D R Ź A J

1	UVOD	1
1.1	Fenolne kiseline	3
1.1.1	Strukturna obilježja i biosinteza fenolnih kiselina	3
1.1.2	Metabolizam i biodostupnost fenolnih kiselina	8
1.1.3	Pregled dosadašnjih istraživanja bioloških učinaka fenolnih kiselina	9
1.2	Botanički podaci o vrstama porodice Lamiaceae	17
1.2.1	Biljne vrste roda <i>Micromeria</i> Benth	19
1.2.1.1	<i>Micromeria croatica</i> (Pers.) Schott	19
1.2.1.2	<i>Micromeria juliana</i> (L.) Benth ex Reichenb.	20
1.2.1.3	<i>Micromeria thymifolia</i> (Scop.) Fritsch	22
1.2.1.4	Pregled dosadašnjih istraživanja sastava polifenola i bioloških bioloških učinaka biljnih vrsta roda <i>Micromeria</i>	23
2	OBRAZLOŽENJE TEME	26
3	EKSPERIMENTALNI DIO	28
3.1	Fenolne kiseline	29
3.2	Istraživani biljni materijal	29
3.3	Fitokemijska istraživanja	31
3.3.1	Materijali	31
3.3.2.	Priprema biljnih ekstrakata vrsta roda <i>Micromeria</i>	33
3.3.3	Ispitivanje prisutnosti fenolnih kiselina i flavonoida tankoslojnom kromatografijom	33
3.3.4	Određivanje fenolnih kiselina	34
3.3.5	Određivanje flavonoida	34
3.3.6	Određivanje trjeslovina i ukupnih polifenola	35
3.3.7	Frakcioniranje biljnih ekstrakata i izolacija fenolnih kiselina i flavonoida	36
3.3.8	Određivanje ružmarinske kiseline metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)	38
3.3.9	Analiza fenolnih kiselina i flavonoida u vezanom sustavu tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-ESI-MS/MS)	39
3.3.10	Prevalidacija metode spektrofotometrijskog određivanja hidroksicimetnih derivata primjenom programskog paketa ESCULAP	41
3.3.11	Ispitivanje fenolnih kiselina metodom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti (HPTLC) u vrstama porodice Lamiaceae	42
3.3.12	Primjena prevalidirane metode spektrofotometrijskog određivanja hidroksicimetnih derivata u vrstama porodica Lamiaceae	42
3.4	Istraživanja bioloških učinaka	44
3.4.1	Priprema biljnih ekstrakata	44
3.4.2	Materijali	44
3.4.3	Istraživanje antioksidacijskog djelovanja	48
3.4.3.1	Priprema uzoraka i standarda	48
3.4.3.2	Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala	48
3.4.3.3	Određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta	49

3.4.3.4	Određivanje sposobnosti redukcije	49
3.4.3.5	Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza	50
3.4.4	Istraživanje citotoksičnog djelovanja	50
3.4.4.1	Priprema ispitivanih uzoraka	50
3.4.4.2	Priprema staničnih kultura	51
3.4.4.3	Određivanje citotoksičnog učinka MTS testom	51
3.4.5	Istraživanje protuupalnog djelovanja	52
3.4.5.1	Priprema ispitivanih uzoraka	52
3.4.5.2	Priprema stanica mišjih splenocita	53
3.4.5.3	Određivanje protuupalnog učinka ELISA metodom	53
3.4.5.4	Određivanje citotoksičnog učinka na mišjim splenocitima MTS testom	56
3.4.6.	Istraživanje antigenotoksičnog djelovanja	56
3.4.6.1	Priprema ispitivanih uzorka	56
3.4.6.2	Priprema uzorka humane krvi	57
3.4.6.3	Ispitivanje antigenotoksičnog učinka komet testom	57
3.5	Statistička analiza	59
4	REZULTATI I RASPRAVA	60
4.1	Fitokemijski sastav vrsta roda <i>Micromeria</i>	61
4.1.1	Prisutnost fenolnih kiselina i flavonoida u vrstama roda <i>Micromeria</i>	61
4.1.2	Sadržaj fenolnih kiselina, flavonoida, trjeslovina i ukupnih polifenola u vrstama roda <i>Micromeria</i>	64
4.1.3	Sadržaj ružmarinske kiseline u liofiliziranim biljnim ekstraktima određen RP-HPLC-DAD metodom	65
4.1.4	Izolacija flavonoida i fenolnih kiselina	67
4.1.5	Identifikacija fenolnih kiselina i flavonoida u vezanom sustavu tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-ESI-MS/MS)	72
4.2	Udjeli fenolnih kiselina u vrstama porodice Lamiaceae	90
4.2.1	Analiza rezultata prevalidacije farmakopejskih metoda određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata	90
4.2.1.1	Karakterizacija analitičkih skupina od 1 do 6	91
4.2.1.2	Provjera graničnih skupina 1 i 6	92
4.2.1.3	Provjera homogenosti podataka	93
4.2.1.4	Provjera odnosa analit-signal	94
4.2.1.5	Prepoznavanje bjegunaca	96
4.2.1.6	Prosudba graničnih vrijednosti	96
4.2.1.7	Metrološke karakteristike metode određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata	97
4.2.2	Primjena prevalidiranih metoda za određivanje hidroksicimetnih derivata	99
4.2.2.1	Prisutnost klorogenske i ružmarinske kiseline u odabranim vrstama porodice Lamiaceae	99
4.2.2.2	Udjeli ukupnih hidroksicimetnih derivata u odabranim vrstama porodice Lamiaceae	101
4.3	Biološki učinci fenolnih kiselina i vrsta roda <i>Micromeria</i>	103
4.3.1	Antioksidacijski učinak	103
4.3.1.1.	Antiradikalna aktivnost	104
4.3.1.2	Ukupni antioksidacijski kapacitet	113
4.3.1.3	Sposobnost redukcije	117

4.3.1.4	Kelirajuća aktivnost	124
4.3.2	Citotoksični učinak	128
4.3.2.1	Citotoksični učinak fenolnih kiselina	128
4.3.2.2	Citotoksični učinak vrsta roda <i>Micromeria</i>	132
4.3.3	Protuupalni učinak	134
4.3.3.1	Učinak fenolnih kiselina na produkciju citokina IL-6	134
4.3.3.2	Učinak etanolnih ekstrakata vrsta roda <i>Micromeria</i> na produkciju citokina IL-6	138
4.3.3.3	Citotoksični učinak fenolnih kiselina i biljnih ekstrakata na mišjim splenocitima	139
4.3.4	Antigenotoksični učinak	142
4.3.4.1	Antigenotoksični učinak fenolnih kiselina	143
4.3.4.2	Antigenotoksični učinak vrsta roda <i>Micromeria</i>	153
5	ZAKLJUČCI	156
6	LITERATURA	162
7	ŽIVOTOPIS	177
8	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	180
9	PRILOZI	

1 U V O D



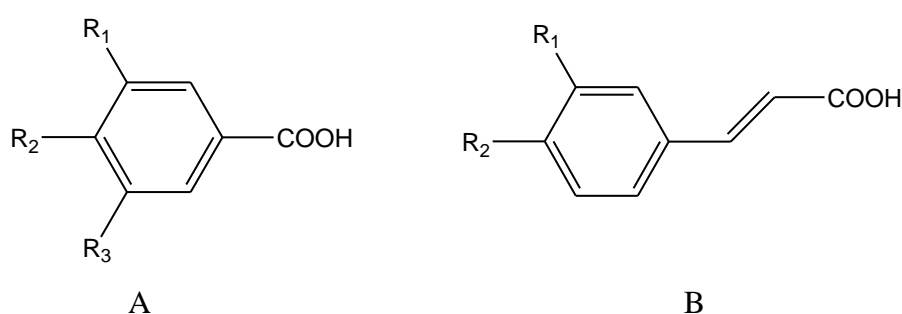
Posljednjih godina raste popularnost i primjena različitih fitopreparata koji se koriste u prevenciji i liječenju mnogih bolesti. Učinkovitost tih pripravaka određena je sadržajem bioaktivnih tvari, često polifenola. Iako se flavonoidi smatraju glavnim bioaktivnim polifenolima, danas se sve više govori o biomedicinskom potencijalu fenolnih kiselina i njihovom blagotvornom djelovanju na zdravlje ljudi. Obzirom da su široko rasprostranjene u biljnom svijetu njihov dnevni unos procjenjuje se na 25 mg do 1 g (Robbins, 2003). U novije vrijeme sve je veći broj znanstvenih radova koji se bave istraživanjem fenolnih kiselina i njihovih prirodnih izvora, bilo kao potencijalnih suvremenih fitoterapeutika ili izvora vodećih spojeva u otkrivanju novih lijekova. Rezultati dosadašnjih znanstvenih istraživanja fenolnih kiselina ukazuju na brojna biološka djelovanja, međutim, još uvijek nisu u potpunosti razjašnjena njihova biološka svojstva niti mehanizmi djelovanja.

Porodica Lamiaceae obiluje ljekovitim biljnim vrstama koje se koriste u suvremenoj fitoterapiji, ali i u tradicionalnoj medicini brojnih naroda. Ove biljne vrste predstavljaju vrijedan izvor biološki aktivnih polifenola, među kojima se ističu fenolne kiseline. Tako je, primjerice, od 96 ispitanih vrsta porodice Lamiaceae kavena kiselina potvrđena u 93 vrste, ružmarinsku kiselinu sadržavalo je svih 77 ispitanih vrsta potporodice Nepetoideae, dok njena prisutnost nije ustanovljena u vrstama potporodice Lamioideae (Janicsák i sur., 1999). Među vrstama porodice Lamiaceae koje rastu u Hrvatskoj posebnu pozornost znanstvenika zaokupljaju nedovoljno istražene endemične i subendemične vrste. Kao potencijalno raznolik i bogat izvor polifenolnih spojeva, za istraživanje u okviru ovog doktorskog rada odabrane su tri vrste roda *Micromeria*: *M. croatica* (Pers.) Schott, *M. juliana* (L.) Benth. ex Reichenb. i *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch.

1.1 Fenolne kiseline

1.1.1 Strukturna obilježja i biosinteza fenolnih kiselina

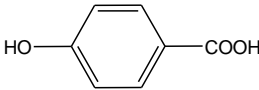
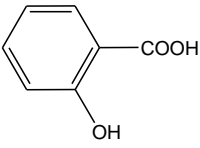
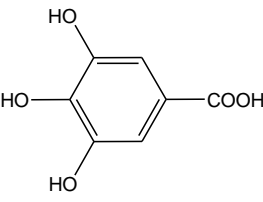
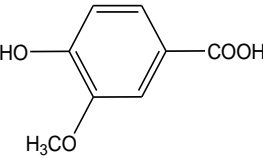
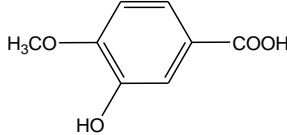
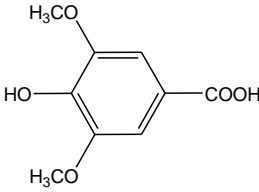
Fenolne kiseline su široko rasprostranjeni biljni sekundarni metaboliti. Pripadaju skupini polifenola s više od 8000 prirodnih spojeva kojima je fenolna struktura, odnosno aromatski prsten s najmanje jednom hidroksilnom skupinom, zajedničko svojstvo (Robbins, 2003). Prema osnovnoj strukturi dijele se na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Slika 1).



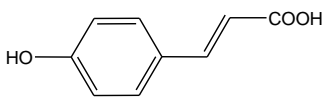
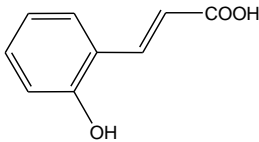
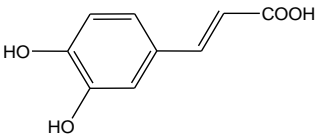
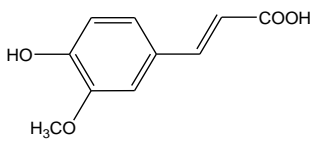
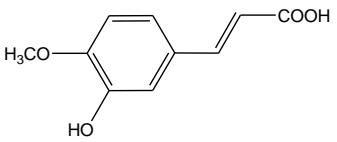
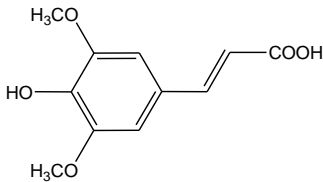
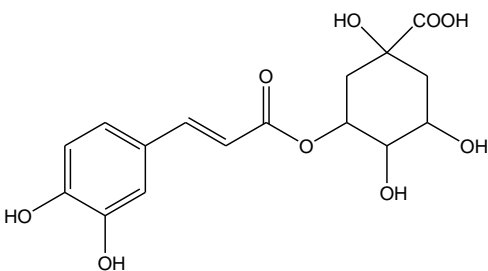
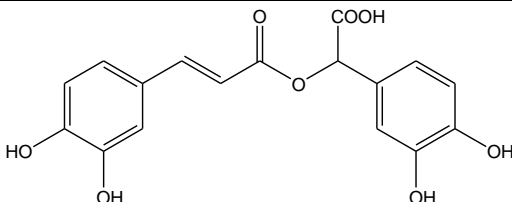
Slika 1. Osnovne strukture hidroksibenzojevih (A) i hidroksicimetnih (B) kiselina

Hidroksibenzojeve kiseline predstavljaju skupinu hidroksiliranih derivata benzojeve kiseline s osnovnom strukturnom jedinicom C₆-C₁, a međusobno se razlikuju u hidroksilaciji i metilaciji benzenskog prstena. Hidroksicimetne kiseline s osnovnom strukturnom jedinicom C₆-C₃ su hidroksilirani derivati cimetne kiseline (Dewick, 2007). Strukture hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina ispitanih u okviru ovog doktorskog rada prikazane su u Tablici 1 i 2. Iako uloga fenolnih kiselina kao sekundarnih metabolita u biljkama još nije u potpunosti razjašnjenja, smatra se da sudjeluju u mnogim procesima kao što su unos nutrijenata, sinteza proteina, aktivnost enzima, fotosinteza, alelopatija i dr. Vrlo malo fenolnih kiselina dolazi u slobodnoj formi. Većina je vezana esterskim, eterskim ili acetalnim vezama za strukturne komponente biljke (celuloza, lignin, proteini), veće polifenole, manje organske molekule (glukoza, kina kiselina) ili druge prirodne spojeve (terpeni). Fenolne kiseline široko su rasprostranjene u voću, povrću, žitaricama ali i u ljekovitim biljnim vrstama (Robbins, 2003). Sadržaj fenolnih kiselina u biljnom materijalu ovisi o mnogim čimbenicima, a najveći utjecaj imaju klima, uvjeti uzgoja te vegetacijsko razdoblje (Arceus i sur., 2013).

Tablica 1. Strukture odabranih hidroksibenzojevih kiselina

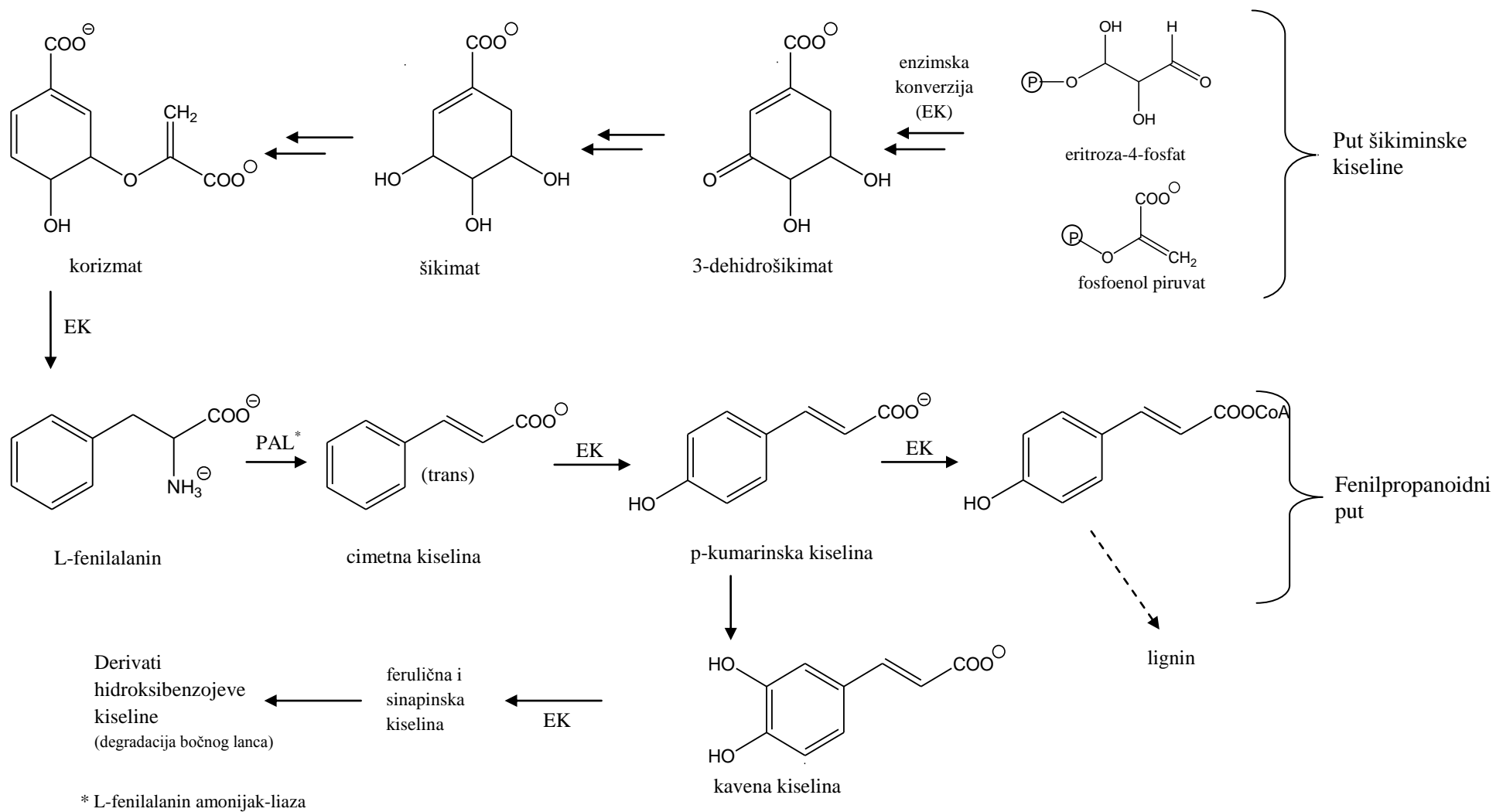
Hidroksibenzojeva kiselina	Struktura
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	
Salicilna kiselina	
Galna kiselina	
Vanilinska kiselina	
Izovanilinska kiselina	
Siringična kiselina	

Tablica 2. Strukture odabranih hidroksicimetnih kiselina

Hidroksicimetna kiselina	Struktura
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	
Kavena kiselina	
Ferulična kiselina	
Izoferulična kiselina	
Sinapinska kiselina	
Klorogenska kiselina	
Ružmarinska kiselina	

Biosinteza fenolnih kiselina

Početni spoj u biosintezi hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina je aromatska aminokiselina L-fenilalanin koja nastaje iz korizmata kao konačnog produkta biosintetskog puta šikiminske kiseline. Naknadno prevođenje L-fenilalanina u različite derivate hidroksicimetne kiseline uključuje tri koraka zajedničkog imena „put sinteze fenilpropanoida“ kojim nastaje većina aromatskih sekundarnih metabolita u biljkama. Prvi korak predstavlja stereospecifična deaminacija, pri čemu nastaje *trans* dvostruka veza u bočnom lancu hidroksicimetnih derivata, nakon čega hidroksilacijom u položaju C-4 aromatskog prstena nastaje *p*-kumarat. Nastanak *p*-kumaril koenzim A estera (CoA ester) odvija se putem enzimske reakcije. Između reakcija stvaranja *p*-kumarata i nastajanja CoA estera odvijaju se reakcije hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena, pri čemu nastaju različite hidroksicimetne kiseline kao što su ferulična, kavena, sinapinska i druge (Slika 2). Za biosintezu hidroksibenzojevih kiselina predložena su dva puta. Osnovni put pretpostavlja degradaciju bočnog lanca hidroksicimetnih derivata, dok alternativni put kreće od 3-dehidrošikimata i uključuje enzimske reakcije njegova prevođenja u različite derivate hidroksibenzojevih kiselina (Dewick, 2007; Robbins, 2003).



Slika 2. Biosintetski put derivata hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina

Preuzeto iz: Robbins RJ. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology J. Agric. Food Chem (2003) 51: 2866-2887.

1.1.2 Metabolizam i biodostupnost fenolnih kiselina

Zbog široke rasprostranjenosti fenolnih kiselina u biljnom svijetu, ljudi ih svakodnevno unose u organizam. Procjenjuje se da čovjek dnevno unese od 25 mg do 1 g fenolnih kiselina, što ovisi o načinu ishrane pojedinca (Robbins, 2003). Biodostupnost fenolnih kiselina je različita i nije nužno da najzastupljenija fenolna kiselina u biljnom materijalu bude ujedno i ona s najvećom koncentracijom aktivnog metabolita u organizmu. Metaboliti prisutni u krvi rezultat su probave i metabolizma u jetri te se obično razlikuju od izvornog spoja. Istraživanja biodostupnosti prirodnih produkata podrazumijevaju ispitivanja kinetike i apsorpcije mjerenjem maksimalne plazmatske koncentracije, vremena potrebnog da se dosegne maksimalna plazmatska koncentracija, poluvremena eliminacije i urinarne ekskrecije nakon unosa određene doze fenolne kiseline koja se može primijeniti kao čista supstancija te kao dio biljnog ekstrakta, napitka ili hrane. Napravljena je opsežna analiza provedenih studija koje su ispitivale biodostupnost fenolnih kiselina. U slučajevima kad je unos klorogenske kiseline bio visok, kao metabolit detektirana je isključivo kavena kiselina. Iako klorogenska kiselina nije pronađena u plazmi i urinu, treba uzeti u obzir da reagensi koji služe za obradu bioloških uzoraka prije mjerenja mogu sadržavati esterazu koja može hidrolizirati klorogensku kiselinu. Hidroksicimetne kiseline imaju relativno brz metabolizam. Usporedbom vrijednosti površina ispod krivulje ($\mu\text{M} \times \text{min}$) dobivena relativna biodostupnost slijedila je niz: klorogenska < ružmarinska < kavena < ferulična < *p*-kumarinska kiselina (Manach i sur., 2005). Današnje spoznaje ukazuju da se hidroksicimetne kiseline metaboliziraju u lumenu crijeva i crijevnoj mukozi te jetri i bubregu, a metabolički put ovisi o strukturi, dozi i postojećim strukturnim oblicima (Zhao i Moghadasian, 2010). Hidroksibenzojeve kiseline su nešto manje zastupljene u biljnim izvorima, pa je tako i manji broj studija koje ispituju njihovu biodostupnost (Lafay, 2008). Rezultati su pokazali da se galna kiselina dobro apsorbira u odnosu na druge polifenole. Nakon unosa 50 mg galne kiseline, koncentracija slobodnog oblika u plazmi dosegla je oko 1,8 μM (Manach i sur., 2005). S obzirom na dokazan brz metabolizam fenolnih kiselina nakon apsorpcije, nužno je poznavati njihove metabolite jer oni mogu zadržati biološku aktivnost nemetabolizirane kiseline, ali i pokazati veću ili manju učinkovitost.

1.1.3 Pregled dosadašnjih istraživanja bioloških učinaka fenolnih kiselina

Pregledom dosadašnjih istraživanja antioksidacijskog djelovanja može se uočiti da su autori najvećim dijelom ispitivali učinak određenih biljnih ekstrakta u usporedbi s najzastupljenijim fenolnim kiselinama, dok su usporedna istraživanja većeg broja fenolnih kiselina manje zastupljena. Tako su Cho i suradnici (2013) ispitivali antioksidacijske sastavnice u biljnoj vrsti *Suaeda japonica* Makino koja se u Koreji tradicionalno primjenjuje za ublažavanje groznice. Siringična kiselina u ispitanoj koncentraciji od 20 μM pokazala je 30%-tnu inhibiciju stvaranja DPPH radikala, dok *p*-hidroksibenzojeva kiselina i vanilinska kiselina u toj koncentraciji nisu pokazale antiradikalnu aktivnost. Također je ispitana sposobnost inhibicije lipidne oksidacije u jetri štakora, pri čemu je blagi učinak postigla samo vanilinska kiselina.

Ispitano je antioksidacijsko djelovanje galne, siringične, sinapinske, protokatehinske, kavene, ferulične, vanilinske, *p*-hidroksibenzojeve i *p*-kumarinske kiseline (Mudnić i sur., 2010). U testiranju TEAC metodom dobar učinak pokazale su galna, sinapinska i ferulična kiselina, dok se u FRAP metodi djelovanjem istaknula galna kiselina.

Sevgi i suradnici (2015) ispitali su antioksidacijski učinak kavene, klorogenske, cimetne, protokatehinske, ružmarinske, ferulične, galne, *p*-hidroksibenzojeve, vanilinske i siringične kiseline koristeći metodu hvatanja DPPH radikala, redukcije trovalentnog željeza (testirane koncentracije 0,1-0,5 mg/mL), keliranja dvovalentnog željeza te metodu izbjeljivanja β -karotena (testirana koncentracija 2 mg/mL). Primjenom svih navedenih postupaka, ružmarinska kiselina pokazala je najbolja antioksidacijska svojstva, dok je učinak kavene, cimetne, ferulične i *p*-hidroksibenzojeve kiseline bio nešto slabiji.

Usporedno ispitivanje kavene i klorogenske kiseline tijekom autooksidacije triacilglicerida iz suncokretova ulja na 100 °C pokazalo je razliku njihovih antioksidacijskih svojstava ovisno o testiranoj koncentraciji. Tako su $2,8 \times 10^{-4}$ M fenolne kiseline pokazale podjednaki učinak, dok je pri koncentraciji od 10×10^{-4} M kavena kiselina bila učinkovitija od klorogenske (Marinova i sur., 2009).

Citotoksični učinak ružmarinske kiseline na staničnim linijama kronične mijeloidne leukemije (K-562), humanog karcinoma dojke (MCF-7 i MDA-MB-231), humanog karcinoma prostate (PC-3 i DU-145) i humanog karcinoma jetre (Hep-G2) ispitali su Yesil-Celiktas i suradnici (2010). U koncentracijama 6,25-50 $\mu\text{g/mL}$ ružmarinska kiselina nije pokazala citotoksični učinak niti na jednoj staničnoj liniji. Klorogenska kiselina poticala je

proliferaciju stanica humanog adenokarcinoma kolona (Caco-2 stanice) u najvećoj ispitanoj koncentraciji od 400 μ M (Duda-Chodak i sur., 2009).

Prasad i suradnici (2011) istraživali su citotoksični učinak kavene kiseline na stanicama humanog fibrosarkoma (HT-1080) i došli do zaključka da kavena kiselina pri koncentracijama 5, 10 i 20 μ g/mL nema značajnijeg utjecaja na vijabilnost stanica, dok u koncentracijama 30, 40 i 50 μ g/mL značajno inhibira rast HT-1080 stanica, pri čemu kod najviše ispitane koncentracije vijabilnost stanica iznosi samo 15%.

U sklopu istraživanja protuupalnog učinka biljne vrste *Artemisia annua* L. de Magalhães i suradnici (2012) ispitali su i inhibitorno djelovanje ružmarinske i klorogenske kiseline na interleukine IL-6 i IL-8. Ružmarinska kiselina u koncentracijama 10-750 μ g/mL inhibirala je produkciju tih protuupalnih citokina u Caco-2 stanicama, dok su učinkovite koncentracije klorogenske kiseline bile iznad 200 μ g/mL.

Singh i suradnici (2012) ispitali su protupalni učinak galne kiseline (1 μ g/mL i 10 μ g/mL) na peritonealnim makrofazima Swiss albino miševa stimuliranih LPS-om, u usporedbi s diklofenakom (1 μ g/mL). Galna kiselina je u obje ispitane koncentracije snažnije inhibirala produkciju citokina IL-6 nego referentni protuupalni lijek.

Ispitivanjem fenolnih sastavnica iz biljne vrste *Aster yomena* Mak koja je na humanoj staničnoj liniji osteosarkoma MG-63 pokazala protuupalno djelovanje, Kim i suradnici (2014) dokazali su doprinos kavene kiseline navedenom učinku budući da je u koncentraciji 100 μ g/mL pokazala značajnu inhibiciju IL-6.

Ferulična kiselina u koncentraciji 50 μ M nije pokazala inhibicijski učinak na IL-8 i IL-6 u humanom intestinalnom epitelu (Sergeant i sur., 2010). Slične rezultate zapazili su također Wang i suradnici (2015) koji su davali štakorima hranu s 2,6 mmol/kg ferulične kiseline. U štakora koji su dobivali feruličnu kiselinu nije dokazano značajnije smanjenje razine proupalnih citokina.

Protuupalni učinak vanilinske kiseline (1-100 μ M) testiran je na peritonealnim makrofazima muških C57B miševa. Najveća postignuta vrijednost inhibicije citokina IL-6 iznosila je 38,62% (Kim i sur., 2011). Usporedno ispitivanje dihidroksiliranih i monohidroksiliranih fenolnih kiselina proveli su Monagas i suradnici (2009) na LPS-om stimuliranim mononuklearnim stanicama periferne krvi zdravih ispitanika. Utvrdili su da monohidroksilirane fenolne kiseline, a među njima i *p*-hidroksibenzojeva kiselina, pri 1 μ M koncentraciji ne utječu na produkciju IL-6.

Antigenotoksično djelovanje ružmarinske kiseline dokazano je u sklopu *in vivo* istraživanja koje su proveli Furtado i suradnici (2015). Wistar štakori dobivali su dnevno 4, 8 i

16 mg/kg ružmarinske kiseline, nakon čega su jednokratno primili 40 mg/kg 1,2 dimetilhidrazina koji uzrokuje oštećenja DNA. Rezultati komet testa ukazali su na značajno smanjenje oštećenja DNA u pokusnih životinja tretiranih različitim koncentracijama ružmarinske kiseline u odnosu na skupinu tretiranu samo 1,2 dimetilhidrazinom.

Protektivni učinak klorogenske kiseline na UVB zračenjem inducirana oštećenja humanih keratinocita (HaCaT) istražili su Cha i suradnici (2014). Stanice su tretirane UVB zračenjem ili klorogenskom kiselinom u koncentraciji 80 μ M. Također je provedeno pretretiranje klorogenskom kiselinom (80 μ M) nakon čega su stanice izložene UVB zračenju. Oštećenja DNA mjerena su komet testom i zapaženo je da klorogenska kiselina ne uzrokuje oštećenja DNA za razliku od UVB zračenja koje je dovelo do povećanja fluorescencije DNA u repu kometa na 74%. Pretretman klorogenskom kiselinom smanjio je tu vrijednost na 30%.

Kavena kiselina također je pokazala protektivni učinak na UVB zračenjem uzrokovana oštećenja u humanim limfocitima (Prasad i sur., 2009). Prije izlaganja UVB zračenju stanice su tretirane kavenom kiselinom u koncentraciji od 1, 5 i 10 μ g/mL, što je dovelo do značajnog smanjenja oštećenja DNA u odnosu na stanice tretirane samo UVB zračenjem.

Suprotno ovim istraživanjima, Prasad i suradnici (2011) izvijestili su o genotoksičnom učinku kavene kiseline na stanicama ljudskog fibrosarkoma HT-1080. Stanice su tretirane kavenom kiselinom u koncentracijama od 30-50 μ g/mL koje su uzrokovale povećanje intenziteta fluorescencije mjerenog komet testom.

U svojim istraživanjima Ferk i suradnici (2011) došli su do zaključka da galna kiselina djeluje protektivno na DNA. U koncentracijama 0,015-0,15 μ g/mL nije uzrokovala formiranje kometa u humanim limfocitima. Nakon izlaganja limfocita vodikovom peroksidu, zapažen je značajan porast kometa. No, predtretiranjem limfocita galnom kiselinom nastajanje kometa smanjeno je za 50%. Suprotno ovom učinku, Weng i suradnici (2015) dokazali su da galna kiselina u stanicama humanog karcinoma usta (SCC-4) uzrokuje oštećenja DNA.

Vanilinska kiselina pokazala je antigenotoksični i genotoksični učinak u ovisnosti o dozi na humanim limfocitima (Erdem i sur., 2012). Ispitano je djelovanje vanilinske kiseline u koncentraciji 1 μ g/mL i 2 μ g/mL te vanilinske kiseline u kombinaciji s genotoksičnim antibiotikom mitomicinom (0,25 μ g/mL). U koncentraciji 1 μ g/mL vanilinska kiselina nije pokazala genotoksični učinak te je značajno smanjila oštećenje DNA uzrokovano mitomicinom, dok su njena genotoksična svojstva zapažena pri koncentraciji 2 μ g/mL.

Uključujući i prethodno navedena istraživanja, Tablica 3 donosi opširniji literaturni pregled bioloških učinaka fenolnih kiselina te njihovu moguću primjenu u praksi.

Tablica 3. Pregled bioloških učinaka i potencijalne primjene fenolnih kiselina

Fenolna kiselina	Biološki učinak	Potencijalna primjena	Literatura
Ružmarinska kiselina	Pokazuje antioksidacijski učinak te stabilizira stanične membrane ^a	Prevenција kemijski uzrokovanog oštećenja stanica i stanične DNA	Pérez-Fons i sur., 2010. Sevgi i sur., 2015.
	Smanjuje oštećenja DNA uzrokovana doksorubicinom ^a i 1,2 dimetilhidrazinom ^b		Furtado i sur., 2010. Furtado i sur., 2015.
	Djeluje baktericidno na sojeve često rezistentne na antibiotike (<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>) ^a	Liječenje infekcija uzrokovanih rezistentnim mikroorganizmima	Abedini i sur., 2013.
	Smanjuje oštećenja u humanim keratinocitima uzrokovana UVB zračenjem ^a	Zaštita kože od UV zračenja	Vostálová i sur., 2010.
	Smanjuje produkciju IFN- γ i IL-4, smanjuje lezije na koži kod NC/Nga miševa tretiranih 2,4-dinitroflorobenzenom koji uzrokuje promjene slične atopijskom dermatitisu ^b Smanjuje razinu IL-6 i IL-8 u Caco-2 stanicama ^a	Prevenција atopijskog dermatitisa i drugih upalnih stanja	Jang i sur., 2011. de Magalhães i sur., 2012.
	Inhibira prolil oligopeptidazu te poboljšava kognitivne sposobnosti miševa ^b	Protektivna uloga kod raznih neuroloških oboljenja	Park i sur., 2010.
	Ima zaštitnu ulogu na neurone prilikom moždanog udara ^a		Fallarini i sur., 2009.
	Prevenira razvoj inducirane Alzheimerove bolesti u transgeničnih miševa ^b		Hamaguchi i sur., 2009.
	Inhibira metastaziranje karcinoma dojke na kosti ^b	Prevenција i terapija karcinoma	Xu i sur., 2010.
Klorogenska kiselina	Inhibira proliferaciju glatkih mišićnih stanica plućne arterije uzrokovanu hipoksijom ^b	Terapija plućne hipertenzije	Li i sur., 2015.
	Povećava osjetljivost hepatocelularnog karcinoma na 5-fluorouracil ^a	Terapija karcinoma	Yan i sur., 2015.

^a *in vitro* eksperimenti; ^b *in vivo* eksperimenti na životinjama; ^c *in vivo* eksperimenti na ljudima; ^d kliničke studije

Tablica 3. Pregled bioloških učinaka i potencijalne primjene fenolnih kiselina

Fenolna kiselina	Biološki učinak	Potencijalna primjena	Literatura
Klorogenska kiselina	Smanjuje prehranom uzrokovanu pretilost i steatozu, poboljšava osjetljivost na inzulin, smanjuje kroničnu upalu kod pretilih miševa ^b	Prevenција i liječenje metaboličkog sindroma	Ma i sur., 2015.
	Smanjuje sistolički i dijastolički krvni tlak ^c	Prevenција hipertenzije	Onakpoya i sur., 2015.
	Dugotrajna primjena djeluje antinociceptivno u štakora s dijabetičkom neuropatijom ^b	Olakšavanje simptoma dijabetičke neuropatije	Bagdas i sur., 2014.
	Pokazuje antiagregacijsko djelovanje i smanjuje stvaranje ugrušaka ^b	Prevenција kardiovaskularnih oboljenja	Fuentes i sur., 2014.
	Smanjuje produkciju IL-1 β u humanim hondrocitima ^b i IL-6 u Caco-2 stanicama ^a	Terapija osteoartritisa i drugih upalnih stanja	Chen i Wu, 2014. de Magalhães i sur., 2012.
	Smanjuje oštećenja humanih HaCaT stanica uzrokovanih UVB zračenjem	Prevenција oštećenja stanica i stanične DNA	Cha i sur., 2014.
Kavena kiselina	Smanjuje agregaciju trombocita i stvaranje tromboksana A ₂ ^a	Prevenција kardiovaskularnih oboljenja	Lee i sur., 2014.
	Djeluje antimikrobno na <i>Staphylococcus aureus</i> i dva klinička rezistentna MRSA soja te inhibira stvaranje biofilma ^a	Antimikrobna terapija infekcija uzrokovanih rezistentnim sojevima	Luís i sur., 2014.
	Inhibira multiplikaciju virusa influence tipa A ^a	Antiviralna terapija influence	Utsunomiya i sur., 2014.
	Smanjuje produkciju TNF- α , IL-6 i IL-1 β citokina kod miševa s kontaktnim dermatitisom ^b ; smanjuje produkciju IL-6 na MG-63 stanicama ^a	Terapija akutnog i kroničnog kontaktnog dermatitisa	Zhang i sur., 2014. Kim i sur., 2014.
	Smanjuje trombocitopeniju i leukopeniju uzrokovanu imatinibom u pacijenata oboljelih od kronične mijeloične leukemije ^d	Olakšavanje nuspojava uzrokovanih kemoterapeuticima	Gan i sur., 2013.

^a *in vitro* eksperimenti; ^b *in vivo* eksperimenti na životinjama; ^c *in vivo* eksperimenti na ljudima; ^d kliničke studije

Tablica 3. Pregled bioloških učinaka i potencijalne primjene fenolnih kiselina - nastavak

Fenolna kiselina	Biološki učinak	Potencijalna primjena	Literatura
Ferulična kiselina	Umanjuje staničnu smrt i odlaganje kolagena uzrokovano cisplatinom kod bubrežnih stanica ^a	Nefroprotektivni učinak	Bunel i sur., 2015.
	Smanjuje oštećenja živaca u hipokampusu uzrokovana hipoksijom, ublažava neurološki deficit i povećava ekspresiju eritropoetina ^b	Neuroprotektivno djelovanje kod cerebralne ishemije	Zhang i sur., 2015.
	Pokazuje antioksidacijsku sposobnost u metodama gašenja radikala, redukcije Fe ³⁺ , keliranja Fe ²⁺ , izbjeljivanja β-karotena i u TEAC metodi ^a	Prevenција oksidacijskog stresa	Sevgi i sur., 2015. Mudnić i sur., 2010.
Izoferulična kiselina	Inhibira glukoneogenezu u jetri i/ili povećava unos glukoze u perifernom tkivu čime smanjuje razinu glukoze u plazmi štakora koji nemaju inzulin ^b	Liječenje dijabetesa	Liu i sur., 2000.
	Smanjuje lipidnu peroksidaciju, hvata DPPH, ABTS, hidroksil i superoksid anion slobodne radikale, reducira Fe ³⁺ i Cu ²⁺	Prevenција oksidacijskog stresa	Wang i sur., 2011.
p-Kumarinska kiselina	Aktivira GABA receptore i djeluje anksiolitički ^{a,b}	Prevenција simptoma anksioznosti	Scheepens i sur., 2014
	Protektivni učinak kod izoproterenolom izazvanog infarkta miokarda u štakora djelujući antioksidacijski i antiapoptotski ^b	Prevenција kardiovaskularnih oboljenja	Mainzen Prince i sur., 2013.
	Smanjuje neurološki deficit te djeluje neuroprotektivno kroz antiooksidacijske i antiapoptotske mehanizme kod inducirane fokalne cerebralne ishemije u štakora ^b	Terapija cerebralne ishemije	Guven i sur., 2015.

^a *in vitro* eksperimenti; ^b *in vivo* eksperimenti na životinjama; ^c *in vivo* eksperimenti na ljudima; ^d kliničke studije

Tablica 3. Pregled bioloških učinaka i potencijalne primjene fenolnih kiselina - nastavak

Fenolna kiselina	Biološki učinak	Potencijalna primjena	Literatura
Sinapinska kiselina	Smanjuje krvni tlak, disfunkciju miokarda i krvnih žila, te kardijalnu fibrozu, oksidacijski stres i aktivnost ACE ^{a,b}	Terapija hipertenzije	Silambarasan i sur., 2014.
	Djeluje protektivno na 1,2-dimetilhidrazinom uzrokovan karcinom kolona u štakora ^b	Prevenција i terapija karcinoma	Balaji i sur., 2014.
	Pokazuje antioksidacijsko djelovanje mjereno TEAC i FRAP metodama	Prevenција kemijski uzrokovanog oštećenja stanica i stanične DNA	Mudnić i sur., 2010.
Galna kiselina	Djeluje antimikrobno na <i>Staphylococcus aureus</i> i dva klinička rezistentna soja MRSA, te inhibira stvaranje biofilma ^a	Antimikrobna terapija kod infekcija uzrokovanih rezistentnim mikroorganizmima	Luís i sur., 2014.
	Pokazuje antioksidacijska svojstva te inhibira α -amilazu i α -glukozidazu ^a	Primjena u liječenju dijabetesa	Adefegha i sur., 2015.
	Smanjuje vaskularnu kalcifikaciju djelujući na BMP2–Smad1/5/8 signalni put ^a	Prevenција ateroskleroze	Kee i sur., 2014.
	Pokazuje antioksidacijsko djelovanje mjereno TEAC i FRAP metodom	Prevenција kemijski uzrokovanog oštećenja stanica i stanične DNA	Mudnić i sur., 2010.
	Smanjuje IL-6 u makrofazima miševa stimuliranih LPS-om ^a	Terapija raznih upalnih stanja	Singh i sur., 2012.
Vanilinska kiselina	Ublažava kliničke simptome ulceroznog kolitisa uzrokovanog dekstran natrij sulfatom inhibirajući ekspresiju COX-2 i aktivirajući transkripciju NF- κ B ^b	Terapija ulceroznog kolitisa i ostalih kroničnih upalnih bolesti probavnog trakta	Kim i sur., 2010.

^a *in vitro* eksperimenti; ^b *in vivo* eksperimenti na životinjama; ^c *in vivo* eksperimenti na ljudima; ^d kliničke studije

Tablica 3. Pregled bioloških učinaka i potencijalne primjene fenolnih kiselina - nastavak

Fenolna kiselina	Biološki učinak	Potencijalna primjena	Literatura
Siringična kiselina	Modulira glikemijski status kod štakora s aloksan induciranim dijabetesom. Uzrokuje smanjenje glukoze u plazmi te povećanje koncentracije inzulina i C-peptida ^b	Primjena u liječenju dijabetesa	Muthukumaran i sur., 2013.
	Pokazuje neuroprotektivno i antioksidacijsko djelovanje i utječe na biokemijske i histopatološke parametre ishemijske ozljede leđne moždine kod štakora. ^b	Profilaksa kod ishemijskih ozljeda leđne moždine	Tokmak i sur., 2015.
<i>p</i>-Hidroksibenzojeva kiselina	Pokazuje antioksidacijsku sposobnost u metodama gašenja radikala, redukcije Fe ³⁺ , keliranja Fe ²⁺ te izbjeljivanja β-karotena ^a	Prevenција oksidacijskog stresa	Sevgi i sur., 2015

^a *in vitro* eksperimenti; ^b *in vivo* eksperimenti na životinjama; ^c *in vivo* eksperimenti na ljudima; ^d kliničke studije

1.2 Botanički podaci o vrstama porodice Lamiaceae

Porodica Lamiaceae (usnače) obuhvaća zeljaste ili drvenaste biljke, četverbridnih stabljika, vrlo često razvijene u obliku grmova. Mogu biti jednogodišnje biljke ili trajnice. Obično imaju jednostavne listove, smještene nasuprotno na stabljici i ograncima. Cvjetovi se razvijaju u pazušcima listova i čine paštaste cvatove. Ocvijeće je dvostruko i gotovo uvijek s jednom ravninom simetrije. U svakom krugu ocvijeća ima po pet članova. Vjenčić je srastao u cijev koja se u gornjem dijelu proširuje i razdvaja najčešće u dvije nejednake usne. Gornja usna s dva režnjića vrlo je kratka i ravna, dok je donja puno dulja, duboko trokrpasta, izrubljenog srednjeg režnjića. Od četiri prašnika, dva su obično dulja, a dva kraća. Plodnica je nadrasla i sastoji se od dva plodna lista koji čine četiri pretinca. Plod je kalavac koji se pri dozrijevanju raspada na četiri suha jednosjemena plodića. Porodica obuhvaća veliki broj vrsta rasprostranjenih u cijelom svijetu, a najviše ih je u zemljama oko Sredozemnog mora i Južnoj Aziji. Najčešće rastu u toplim predjelima na vapnenastoj podlozi, pa su i u Hrvatskoj najrasprostranjenije u primorskom području, no zastupljene su s mnogo oblika i u flori unutrašnjih krajeva (Šilić, 1984; Tutin i Wood, 1972).

Porodica Lamiaceae je vrlo raznolika te uključuje oko 236 rodova. U hrvatskoj flori zastupljeno je 37 rodova s 226 vrsta i podvrsta. Značajniji rodovi su: *Ballota* (crna kopriva), *Calamintha* (gorska metvica), *Clinopodium* (bukvica), *Galeopsis* (šupljozub), *Glechoma* (dobričica), *Lamium* (mrtva kopriva), *Lavandula* (lavanda), *Leonurus* (srčenica), *Lycopus* (vučja noga), *Marrubium* (marulja), *Melissa* (matičnjak), *Melittis* (medenika), *Mentha* (menta), *Nepeta* (mačja metvica), *Ocimum* (bosiljak), *Origanum* (origano), *Rosmarinus* (ružmarin), *Salvia* (kadulja) i *Thymus* (majčina dušica). Vrste ove porodice većinom su začinske, aromatične i ljekovite biljke (Slika 3), a neke se pojavljuju kao korovi. Mnoge vrste su samonikle u našim krajevima, a veliki broj vrsta se uzgaja za potrebe farmaceutske, kozmetičke i prehrambene industrije, najviše radi eteričnih ulja koja daju karakterističan miris i okus vrstama ove porodice (Kuštrak, 2005).



Salvia officinalis L.



Mentha x piperita L.



Origanum vulgare L.



Melissa officinalis L.



Lavandula angustifolia Mill.



Thymus vulgaris L.

Slika 3. Farmaceutski značajne biljne vrste porodice Lamiaceae

1.2.1 Biljne vrste roda *Micromeria* Benth

Rod *Micromeria* (bresine ili vrisići) iz porodice Lamiaceae prvi put opisuje G. Benth 1834. godine. Vrste tog polimorfnoga grma su mali, razgranjeni i često aromatični polugrmovi koji uglavnom rastu na kamenjaru i u pukotinama stijena mediteranske i submediteranske zone. Rod obuhvaća 130 vrsta sa središtem rasprostranjenosti u zemljama Sredozemlja. U Hrvatskoj raste devet vrsta roda *Micromeria*: *M. croatica* (Pers.) Schott, *M. dalmatica* Benth, *M. graeca* (L.) Benth ex Reichenb., *M. fruticulosa* (Bertol. in Desv.) Grande, *M. juliana* Benth ex Reichenb., *M. kernerii* Murb., *M. microphylla* (D'Urv.) Benth, *M. pseudocroatica* Šilić i *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch (Šilić, 1979; Kalodera i Vladimir 1992).

Vrste ovoga roda karakteriziraju sitni, širokojajasti ili okruglasti ili kopljasti do linealni listovi s manje-više preklopljenim rubom. Cvjetovi su sjedeći na kratkim stapkama. Sakupljeni su u rastresite prividne metlice ili grade dugačak isprekidan grozd; sitni su, purpurni, crvenoljubičasti ili bijeli. Čaške su cjevaste ili cjevasto-zvonaste, pravilne s 5 jednakih ili gotovo jednakih ušiljenih zubaca i sa 13-15 uzdužnih žila. Vjenčić je dvousan s plosnatom gornjom i trolapnom donjom usnom. Pod gornjom usnom se nalaze 4 dvomoćna prašnika koja ne izviru iz vjenčića. Orašićasti plodići su vretenasti ili jajasto vretenasti, pretežno tamnosmeđe boje, goli ili samo pri vrhu sa čuperkom dlačica (Šilić, 1979).

1.2.1.1 *Micromeria croatica* (Pers.) Schott

Sinonimi: *Thymus croaticus* Pers., *Calamintha croatica* (Pers) Host, *Micromeria piperella* (Vis.) var. *croatica* (Pers.) Benth, *Satureja croatica* (Pers.) Briquet, *Mentha croatica* Welden.

Hrvatska bresina aromatična je niska trajnica kratkih stabljika združenih u busen koje su slabo razgranjene i obrasle dlakama (Slika 4). Stabljika je eliptična ili okrugla, s tankom i sjajnom ljubičasto nahukanom korom. Nasuprotni listovi s 3-4 izrazito savijene žile gotovo su sjedeći; cjelovitog su i blago uvrnutog ruba i s obje strane obrasli bijelim dlačicama, naročito u položaju žila. Lice plopke je tamnozeleno, a naličje svjetlozeleno, s rijetkim uljnim žlijezdama, dok su pojedini listovi često ljubičasto nahukani. Donji listovi su okruglasti sa zaokruženim ili plitko srcastom osnovom, srednji listovi su okruglasti do izduženo jajasti, dok su gornji eliptični ili jajasti. Po 2 do 3 cvijeta zajedno su u pazušcima listova. Čaška je duga 5-6 mm i dlakava dok su zupci čaške uspravni i kopljasti. Ružičasto do ljubičasto obojen vjenčić prosječno je 2,5 puta duži od čaške.

Hrvatska bresina cvate od lipnja do rujna. Endemična je biljka sjeverozapadnog dijela Dinarskih planina, osobito Velebita, te karakteristična vrsta toga područja. Raste u pukotinama stijena s humusom i na kamenjarskim travnjacima gorskog i preplaninskog područja. Rasprostranjena je u Lici, Krbavi i Gorskom kotaru (Tutin i sur., 1972, Šilić 1984; Forenbacher, 2001).



Slika 4. *Micromeria croatica* (Pers.) Schott

1.2.1.2 *Micromeria juliana* (L.) Bentham ex Reichenb.

Sinonimi: *Satureja juliana* L.; *Sabbatia corymbosa* Moench

Primorska bresina je višegodišnji zeleni grm s brojnim, tankim, uspravnim, jednostavno granatim, tupo četverostranim i dlakavim stabljikama (Slika 5). Listovi su sjedeći, kraći od internodija. Donji listovi su izduženo eliptični, 7-10 mm dugi i oko 3-4 mm široki, na vrhu su tupi, pri dnu usko zaokruženi, po rubu cjeloviti ili blago uvrnuti, na licu tamnozeleni, rijetko dlakavi, a na naličju sivkasti s gustim spletom bijelih dugih dlačica i s rijetkim uljnim žlijezdama. S obje strane imaju 3-4 istaknute žile pod oštrim kutom. Srednji listovi su lancetasti, 4-7 mm dugi i oko 1,5-2,5 mm široki, na licu i naličju gusto dlakavi. Gornji listovi su usko lancetasti, pri vrhu tupi, oko 3-5 mm dugi i 0,6-1,0 mm široki, gotovo paralelnih rubova i gusto dlakavi. Pojedinačni mali cvjetovi smješteni su u mnogocvjetnim, zbijenim račvicama na kratkim dlakavim stapkama, složenim u isprekidan grozd. Pricvjetni listovi su usko lancetasti, kopljasto šiljasti, gusto dlakavi, za polovinu kraći od čaške. Čaška je zvonasta, sivozelena, izvana gusto štršeće dlakava. Zupci su podjednako dugi, usko trouglasti

i ušiljeni te oko 2,5-3 puta kraći od cijevi čaške koja ima oštre usjeke u obliku slova "V". Cijev čaške i zupci s unutrašnje strane su goli i sjajni. Vjenčić je ružičasto-purpurne boje, samo izvana dlakav, oko 4-4,5 mm dug. Gornja usna je zaobljena, pri vrhu usječena, dok je donja duboko trokrpasta. Režnjevi su zaobljeni, a srednji nešto veći od bočnih. Prašnici ne izviruju iznad vjenčića. Njuška tučka je duboko rascijepljena i malo nadvisuje vjenčić. Poluzagasiti smeđi orašasti plodići su vretenasti, paralelnih bočnih strana, oko 1 mm dugi i 0,3-0,4 mm široki. Pri osnovisu tupo klinasti, a pri vrhu naglo suženi i izvučeni u markantan tupi vrh.

Cvate od svibnja do srpnja. Stanište ove biljke predstavljaju kamenjari i pukotine vapnenastih stijena mediteranskog i submediteranskog područja. Primorska bresina prodire dolinama rijeka dosta duboko u unutrašnjost. Pojavljuje se u rasponu od 0-800 m nadmorske visine. Rasprostranjena je od jadranskog primorja do Turske. U Hrvatskoj je rasprostranjena u Istri i Kvarnerskom primorju te u sjevernoj, srednjoj i južnoj Dalmaciji (Tutin i sur., 1972, Šilić 1979; Kalodera i Vladimir, 1992).



Slika 5. *Micromeria juliana* (L.) Bentham ex Reichenb.

1.2.1.3 *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch

Sinonimi: *Satureja thymifolia* Scopoli, *Satureja rupersis* Wulfen in Jacq., *Melissa alba* Waldst. & Kit., *Thymus albus* (Waldst. & Kit.) Link, *Calamintha thymifolia* (Scop.) Reichenb., *Melissa thymifolia* Benth, *Micromeria rupestris* (Wulfen) Benth

Gorska bresina je višegodišnji i vrlo aromatični polugrm tankih i krhkih grana sjajne kore (Slika 6). Stabljike su visoke 20-40 cm, u gornjim dijelovima zelene, a u donjim smeđe ili sivosmeđe. Listovi su tanki, blijedozelene boje i goli s 5-6 mm dugom peteljkom. Oblika su jajasto-kopljastog, tupog vrha, cjelovitog ruba ili tupo nazubljeni, dugi 10-20 mm a široki 3-8 mm. Gornji listovi se naglo smanjuju prelazeći u zoni cvjetova u pricvjetne listove. Na donjoj strani listova ističu se 2-4 para, poput luka savijenih žila. Cvjetovi se skupljaju u duge klasaste cvatove sastavljene od 8-18 pršljenasto raspoređenih skupina od 5-10 cvjetova na kratkim peteljka. Zelena ili blijedoljubičasta čaška s 13 jako istaknutih žila duga je oko 3 mm, cjevasta, gola ili fino pleglo dlakava, žljezdasto točkasta sa trokutastim zupcima koji su oko 6 puta kraći od cijevi. Vjenčić ima 4-5 mm dugu bijelu cijev i dvije usne. Gornja usna je bjeličasta do svijetloljubičasta, donja usna trokrpasta, bijela s ljubičastim šarama. Prašnici i tučak jasno nadvisuju gornju usnu, dok tučak, s njuškom rascijepljenom na dva nejednaka dijela, znatno nadvisuje prašnike. Polusjajni, smeđi plodići (oraščići) jajasto su vretenasti, 0,8-1 mm dugi i 0,4-0,5 mm široki, pri vrhu suženi u obliku tupog kljuna, dok su pri dnu zaobljeni ili tupo izduženo klinasti.

Cvate od srpnja do listopada. Raste u pukotinama raspucanih, pretežno vapnenastih stijena. Budući da je česta biljka dubokih klisura, nalazi se u širokom rasponu od 30 pa do blizu 2000 m nadmorske visine. *M. thymifolia* je element ilirske flore s disjunkcijom u sjevernoj Mađarskoj (Tutin i sur., 1972, Šilić 1984; Kalodera i Vladimir, 1992).



Slika 6. *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch

1.2.1.4 Pregled dosadašnjih istraživanja polifenolnih sastavnica i bioloških učinaka biljnih vrsta roda *Micromeria*

Fitokemijski sastav polifenola u vrstama roda *Micromeria* općenito je slabo istražen. Derivati luteolina, apigenina i kvercetina detektirani su u vrsti *M. croatica* (Pers.) Schott (Stanić i sur., 1988). Marin i suradnici (2001) potvrdili su prisutnost akacetin 7-O-[6'''-O-acetil- β -glukopiranozil(1''' \rightarrow 2'')] α -ramnopirazonil (1''' \rightarrow 6'') β -glukopiranozila i akacetin-7O-ramnozil(1''' \rightarrow 6'') glukozida u metanolnim ekstraktima različitih vrsta roda *Micromeria*. Sadržajem navedenih flavonoida posebice su se isticale vrste *M. dalmatica* Benth. i *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch, dok su u vrstama *M. cristata* (Hampe.) Gris. i *M. juliana* (L.) Benth. bili slabo zastupljeni. Ustanovljene kvantitativne razlike u sadržaju akacetinskih glikozida značajno su pridonijele kemotaksonomiji roda *Micromeria*. Biljne vrste s većim sadržajem akacetinskih glikozida (*M. albanica* (Gris ex K. Maly) Šilić, *M. dalmatica*, *M. thymifolia*) svrstane su u sekciju *Pseudomelissa*, dok su vrste s manjim sadržajem svrstane u sekciju *Eumicromeria* (*M. cristata* i *M. juliana*). Neoporcin (izosakuranetin-7-rutinozid) i naringenin detektirani su u vrstama *M. juliana*, *M. thymifolia*, *M. graeca*, *M. fruticulosa* i *M. montana* (L.) Rechb. (Bellino i sur., 1980).

Thomas-Barberan i suradnici (1991) ispitali su sastav flavonoida u 11 vrsta roda *Micromeria* podrijetlom iz sredozemnog područja. Prisutnost 5,6-dihidroksiflavona ustanovljena je u nepolarnim ekstraktima triju vrsta. *M. graeca* (L.) Benth., *M. fruticulosa* (L.) Druce i *M. serpyllipia* sadržavale su 5,6,4'-trihidroksi-7,8,3'-trimetoksi flavon (timonin) i 5,6,4'-trihidroksi-7,39-dimetoksi flavon. *M. fruticulosa* i *M. serpyllipia* sadržavale su i 5,6-dihidroksi-7,3',4'-trimetoksi flavon.

Skaltsa i suradnici (1994) su iz vrste *M. juliana* izolirali sljedeće flavonoide: apigenin, genkvanin, luteolin- i apigenin-7-O-glukozid i 7-O-galaktozid, luteolin 3',7-di-O-glukuronid, viteksin, vicanin-2 i orientin.

U vrstama *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* dokazane su ružmarinska, klorogenska, kavna i ferulična kiselina (Vladimir-Knežević i sur., 2014).

Fitokemijski sastav etanolnog ekstrakta vrste *M. barbata* Boiss. & Kotschy istražili su Ghanem i suradnici (2014). RP-HPLC metodom kvantificirali su fenolne kiseline (galnu, elagnu, klorogensku, siringičnu, vanilinsku, kavnu, hidroksibenzojevu, sinapinsku, feruličnu, kumarinsku i cimetnu kiselinu) te flavonoide (miricetin, hesperetin, naringenin, kvercetin).

Öztürk i suradnici (2011) izolirali su izotimonin-4'-metileter, sudahitin, izomukronulatol i rutin iz acetonskog ekstrakta vrste *M. cilicica* Hausskn. ex P.H. Davis.

Istraživanja bioloških učinaka vrsta roda *Micromeria* najvećim dijelom obuhvaćaju eterična ulja, dok su biološka svojstva polifenolnih sastavnica slabo istražena. Ustanovljen je široki spektar antimikrobnog učinka etanolnog ekstrakta listova biljne vrste *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch. Primjenom metoda difuzije i dilucije dokazano je djelovanje na 47 vrsta mikroorganizama koji su uključivali bakterije, gljivice i dermatofite (Kalođera i sur., 1993; Vladimir-Knežević i sur., 1994).

Istraženo je antimikrobno djelovanje ekstrakata različite polarnosti vrste *M. nervosa* (Desf.) Benth. Etanolni ekstrakt djelovao je bolje od etilacetatnog, petroleterskog i vodenog ekstrakta, a najveću osjetljivost pokazala je *Candida albicans* (Ali-Shtayeh i sur., 1997).

Dokazano je također da metanolni i kloroformski ekstrakti nadzemnih dijelova vrsta *M. cilicica* Hausskn. ex P.H.Davis, *M. dolichodontha* P.H. Davis i *M. cremnophila* subsp. *amana* (Rech. fil.) P.H. Davis posjeduju antibakterijska svojstva (Dulger, 2008).

U *in vitro* uvjetima etanolni ekstrakt vrste *M. graeca* (L.) Benth. ex Reichenb. pokazao je antioksidacijska svojstva usporediva s α -tokoferolom (Couladis i sur., 2003).

Güllüce i suradnici (2004) ustanovili su da metanolni ekstrakt vrste *M. fruticosa* (L.) Druce subsp. *serpyllifolia* (Bieb) PH Davis ne djeluje antimikrobno, ali posjeduje dobra antioksidacijska svojstva. Vodeni ekstrakti navedene biljne vrste djelovao je citotoksično na stanice humanog karcinoma kolona (HCT) i karcinoma dojke (MCF7). Oralno apliciran miševima u dozama 100 i 200 mg/kg pokazao je analgetski učinak (Shehab i Abu-Gharbieh, 2012). Protuupalni i gastroprotektivni učinak vodenog ekstrakta vrste *M. fruticosa* subsp. *serpyllifolia* ispitan je na miševima kojima je oralno aplicirano 50, 100 i 200 mg/kg ekstrakta (Abu-Gharbieh i sur., 2013). Doza od 200 mg/kg značajno je umanjila karagenanom induciranu upalu šape. Ekstrakt primijenjen u dozama 100 i 200 mg/kg uzrokovao je smanjenje vaskularne permeabilnosti i aktivnosti mijeloperoksidaze. Indometacinom inducirane lezije u gastrointestinalnom traktu značajno su se smanjile nakon primjene 200 mg/kg biljnog ekstrakta.

Antioksidacijsko djelovanje vrste *M. cristata* (Hampe) Griseb. istraženo je u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Ustanovljeno je da eterski, etilacetatni i butanolni ekstrakti posjeduju sposobnost hvatanja DPPH i OH slobodnih radikala te da smanjuju oštećenje jetre štakora inducirano primjenom CCl₄ (Panovska i Kulevanova, 2010).

Öztürk i suradnici (2011) dokazali su da acetonski ekstrakt i izolirane polifenolne sastavnice vrste *M. clicica* posjeduju antioksidacijsko djelovanje te sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze.

Formisano i suradnici (2014) ispitali su antioksidacijski učinak ekstrakata vrste *M. myrtifolia* Boiss. različite polarnosti. Utvrdili su bolja antioksidacijska svojstva metanolnog ekstrakta u odnosu na kloroformski i heksanski ekstrakt koji su sadržavali manje polifenola.

2 OBRAZLOŽENJE TEME



Fenolne kiseline su biljne sastavnice izraženog biomedicinskog potencijala koje se danas sve više istražuju kao mogući suvremeni fitoterapeutici ili vodeći spojevi u otkrivanju novih lijekova. Porodica Lamiaceae predstavlja potencijalno raznolik i bogat izvor fenolnih kiselina, ali i drugih polifenola. Hrvatska flora obiluje brojnim vrstama ove porodice, među kojima se ističu nedovoljno istražene endemične i subendemične vrste. Stoga su, uz fenolne kiseline, za istraživanje u okviru ovog doktorskog rada odabrane tri vrste roda *Micromeria*: *M. croatica* (Pers.) Schott, *M. juliana* (L.) Benth. ex Reichenb. i *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch.

Postavljeni ciljevi istraživanja su:

- Fitokemijski karakterizirati etanolne ekstrakte odabranih biljnih vrsta roda *Micromeria* s obzirom na sastav fenolnih kiselina i flavonoida
- Provesti prevalidaciju metoda za određivanje ukupnih derivata *orto*-dihidroksicimetne kiseline koje se mogu primijeniti u istraživanju fenolnih kiselina u vrstama porodice Lamiaceae.
- Usporedno istražiti antioksidacijsko djelovanje hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina te etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Micromeria* koristeći metode hvatanja slobodnih radikala, keliranja metalnih iona, redukcije željeza te određivanja ukupnog antioksidacijskog kapaciteta.
- Ispitati potencijalna citotoksična svojstva kiselina i ekstrakata na komercijalno dostupnim tumorskim staničnim linijama.
- U *in vitro* uvjetima ispitati učinak fenolnih kiselina i biljnih ekstrakata na produkciju IL-6 citokina u mišjim splenocitima (protuupalno djelovanje).

3 EKSPERIMENTALNI DIO



3.1 Fenolne kiseline

U okviru doktorskog rada istraženi su biološki učinci 14 fenolnih kiselina biljnog podrijetla:

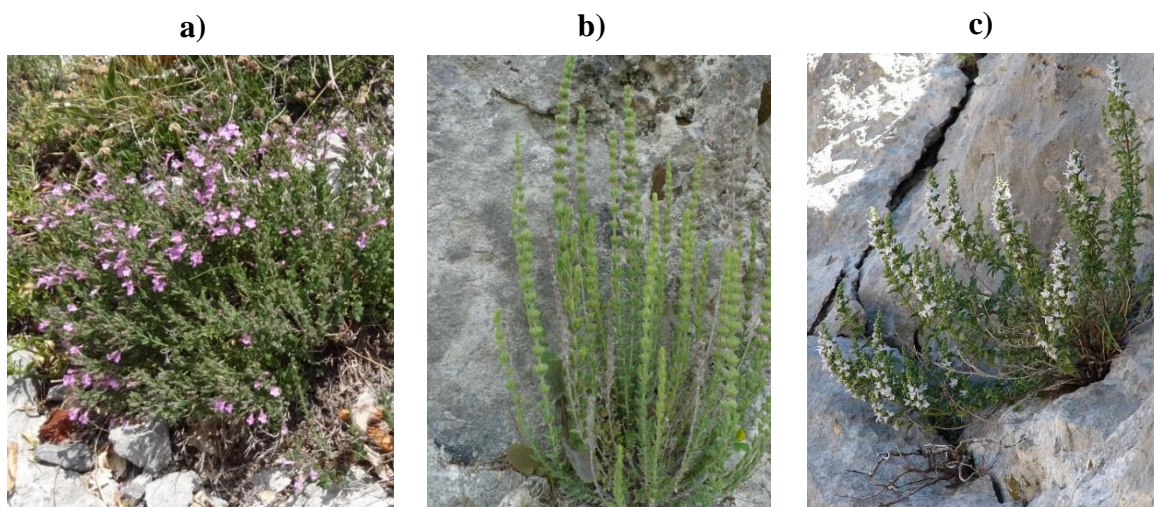
- ferulična kiselina ≥ 98 % (Fluca, Buchs, Švicarska)
- galna kiselina ≥ 95 % (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- izoferulična kiselina ≥ 98 % (Fluca, Buchs, Švicarska)
- izovanilinska kiselina ≥ 95 % (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- kavena kiselina ≥ 98 % (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- klorogenska kiselina ≥ 98 % (Fluca, Buchs, Švicarska)
- *o*-kumarinska kiselina ≥ 95 % (Fluca, Buchs, Švicarska)
- *p*-hidroksibenzojeva kiselina ≥ 95 % (Sigma –Aldrich, St Louis, SAD)
- *p*-kumarinska kiselina ≥ 95 % (Fluca, Buchs, Švicarska)
- ružmarinska kiselina ≥ 95 % (Fluca, Buchs, Švicarska)
- salicilna kiselina ≥ 95 % (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- sinapinska kiselina ≥ 95 % (Fluca, Buchs, Švicarska)
- siringična kiselina ≥ 95 % (Fluca, Buchs, Švicarska)
- vanilinska kiselina ≥ 95 % (Fluca, Buchs, Švicarska).

3.2 Istraživani biljni materijal

A) Nadzemni dijelovi triju odabranih vrsta roda *Micromeria* Benth (Lamiaceae) sakupljani su u razdoblju pune cvatnje tijekom lipnja i srpnja 2010. i 2011. godine na različitim lokacijama u Republici Hrvatskoj (Slika 7).

Identifikacija biljnog materijala provedena je na Zavodu za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, gdje su pohranjeni autentični uzorci pod brojevima L1181, L1185 i L1189. Prikupljeni biljni materijal osušen je na zraku, uz zaštitu od svjetlosti.

Biljna vrsta	Lokacija sakupljanja
<i>Micromeria croatica</i> (Pers.) Schott	Veliko Libinje, 950 m nadmorske visine
<i>Micromeria juliana</i> (L.) Benth. ex Reichenb.	Borovci, 50 m nadmorske visine
<i>Micromeria thymifolia</i> (Scop.) Fritsch	Učka, 1200 m nadmorske visine



Slika 7. Odabrane vrste roda *Micromeria*: a) *M. croatica*; b) *M. juliana*; c) *M. thymifolia*

B) Osim navedenih vrsta roda *Micromeria* Benth. koje su podvrgnute opsežnim fitokemijskim i biološkim istraživanjima u okviru doktorskog rada, predmetom ispitivanja bilo je još 29 drugih biljnih vrsta hrvatske flore iz porodice Lamiaceae: *Acinos arvensis* (Lam.) Dandy; *Calamintha grandiflora* (L.) Moench; *C. officinalis* Moench; *C. sylvatica* Bromf.; *Hyssopus officinalis* L.; *Lamium album* L.; *L. purpureum* L.; *Lavandula angustifolia* Mill.; *Lavandula x intermedia* Emeric ex Lois.; *Marrubium incanum* Desr.; *M. vulgare* L.; *Melissa officinalis* L.; *Mentha longifolia* (L.) Huds; *M. x. piperita* L.; *M. pulegium* L.; *Micromeria graeca* (L.) Benth. Ex Reich.; *Ocimum basilicum* L.; *Origanum heracleoticum* L.; *O. vulgare* L.; *Rosmarinus officinalis* L.; *Salvia officinalis* L.; *S. sclarea* L.; *Satureja montana* L.; *S. subspicata* Bartl. Ex Vis; *Teucrium montanum* L.; *Thymus longicaulis* C. Presl; *T. pulegioides* L.; *T. serpyllum* L. supsp. *serpyllum*; *T. striatus* Vahl.

3.3 Fitokemijska istraživanja

3.3.1 Materijali

Instrumenti i pribor

- analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska-SAD)
- centrifuga EBA 20 (Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Njemačka)
- kolona za tekućinsku kromatografiju Kinetex C18 dimenzija 100 x 2,1 mm i promjera zrna punila 2,8 μm (Phenomenex, Torrance, SAD)
- kolona za tekućinsku kromatografiju Zorbax SB C-18 dimenzija 150 x 2,1 mm i promjera zrna punila 3,5 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- maseni spektrometar LCQ Deca Xp (Thermo Finnigan, San Jose, SAD)
- maseni spektrometar LTQ XL (Thermo Finnigan, San Jose, SAD)
- membranski filtri veličine pora 0,22 μm (Milipore, Bedford, SAD)
- ploče za tankoslojnu kromatografiju HPTLC Silikagel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ploče za tankoslojnu kromatografiju HPTLC Silikagel RP-18 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- rotacijski vakum-uparivač Büchi (Büchi labortechnik AG, Postfach, Švicarska)
- sakupljač frakcija BioFrac (Bio-Rad, Hercules, SAD)
- SPE kolona Isolute C-18 (EC) (Biotage, Uppsala, Švedska)
- tekator Cyclotec (Foss, Hilleroed, Danska)
- tekućinski kromatograf La Chrom 1100 s DAD detektorom (Hitachi, Tokio, Japan)
- tekućinski kromatograf UltiMate 3000 RS (ThermoScientific, Sunnyvale, SAD)
- tekućinski kromatograf Surveyor (Thermo Finnigan, San Jose, SAD)
- ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- uređaj za snimanje i pohranjivanje kromatograma Camag reprostar 3 (Camag, Muttenz, Švicarska)
- UV-VIS spektrofotometar Helios γ (Spectronic unicam, Cambridge, Velika Britanija).

Reagensi, standardi i ostale kemikalije

- aceton p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- acetonitril HPLC čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- akacetin $\geq 98\%$ (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- apigenin-monoglukoza $\geq 98\%$ (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- aluminijev klorid p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- diizopropil eter p.a. (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- etilacetat p.a. (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- etilmetilketon p.a. (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- β -etilaminoester difenilboratne kiseline p.a. (NST) (Fluca, Buchs, Švicarska)
- etilformijat p.a. (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- etanol p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ferulična kiselina $\geq 98\%$ (Fluca, Buchs, Švicarska)
- Folin-Ciocalteu' reagens (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- heksametilentetramin (Fluca, Buchs, Švicarska)
- izosakuranetin $\geq 95\%$ (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- kavna kiselina $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- kloridna kiselina 28% p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kazein p.a. (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- kemferol $\geq 95\%$ (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- kloroform p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- klorogenska kiselina $\geq 98\%$ (Fluca, Buchs, Švicarska)
- kvercetin $\geq 98\%$ (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- luteolin $\geq 95\%$ (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- luteolin-5-glukoza $\geq 95\%$ (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- luteolin-7-glukoza $\geq 98\%$ (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)
- metanol HPLC čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- mravlja kiselina HPLC čistoće i p.a. (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- natrijev acetat trihidrat p.a. (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- natrijev citrat p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrij karbonat dekahidrat p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev molibdat p.a. (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)

- natrijev nitrit p.a. (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- octena kiselina p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- polietilenglikol 4000 p.a. (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- rutin ≥ 98 % (Fluca, Buchs, Švicarska)
- ružmarinska kiselina ≥ 95 % (Fluca, Buchs, Švicarska)
- Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- taninska kiselina p.a. (Fluca, Buchs, Švicarska)
- tetrahidrofuran p.a. (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- toluen p.a. (Merck, Darmstadt, Njemačka)

3.3.2 Priprema biljnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria*

Osušeni i praškasto usitnjeni nadzemni dijelovi ispitivanih vrsta roda *Micromeria* (20,00 g) ekstrahirani su s 200 mL 70%-nog etanola na ultrazvučnoj kupelji 30 minuta. Dobiveni ekstrakti filtrirani su preko Whatman br. 1 filter-papira, uz pomoć Büchnerovog lijevka. Biljni materijal koji je zaostao na filter-papiru ponovo je ekstrahiran na gore naveden način. Sjedinjeni filtrati su upareni primjenom rotacijskog vakuum-uparivača pri 50 °C, a dobiveni smolasti ostatak je liofiliziran. Iskoristivost ekstrakcije određena je prema propisu Europske farmakopeje (EDQMa, 2004), a iznosila je 21,60 %, 19,25 % i 18,28 % za ekstrakte vrsta *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia*. Pripremljeni biljni ekstrakti pohranjeni su na -20 °C i korišteni kao uzorci za fitokemijska ispitivanja.

3.3.3 Ispitivanje prisutnosti fenolnih kiselina i flavonoida tankoslojnom kromatografijom

Ispitivanje prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina u etanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Micromeria* provedeno je na tankom sloju silikagela 60 F₂₅₄, na koji su u jednu točku nanosili uzorci (10 µL) i otopine standarda (5 µL). Kao pokretne faze korištene su različite smjese otapala:

- diizopropileter-aceton-mravlja kiselina-voda 5:3:1:1 (V/V/V/V)
- etilacetat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V/V)
- kloroform-etilacetat 6:4 (V/V/V/V).

Detekcija odijeljenih sastavnica provedena je promatranjem kromatograma pod UV svjetlom pri 365 nm, nakon prskanja 1%-tnom metanolnom otopinom β -etilaminoestera difenilboratne kiseline (NST) i 5%-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000 (PEG). Otopine poredbenih supstancija pripremljene su otapanjem u metanolu u koncentraciji 0,05% (Wagner i Bladt 2009; Fecka i Turek, 2008).

3.3.4 Određivanje fenolnih kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u nadzemnim dijelovima ispitivanih vrsta roda *Micromeria* provedena je spektrofotometrijskim metodom prema farmakopejskom postupku (EDQMb, 2004). Praškasto usitnjena biljna droga (0,200 g) ekstrahirana je s 80 mL 50%-tnog etanola zagrijavanjem 30 minuta u tikvici na kipućoj vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Nakon hlađenja i filtriranja, filtrat je u odmjerne tikvici razrijeđen do 100,0 mL 50%-tnim etanolom. Alikvot od 1,0 mL ekstrakta prenesen je u odmjernu tikvicu od 10 mL, u koju je potom redom dodano: 2 mL 0,5 M kloridne kiseline, 2 mL otopine pripravljene otapanjem 10 g natrijeva nitrita i 10 g natrijeva molibdata u 100 mL vode, te 2 mL 8,5%-tne otopine natrijevog hidroksida. Sadržaj tikvice nadopunjen je vodom do oznake i apsorbancija dobivene otopine odmah izmjerena na 505 nm. Kompenzacijska otopina pripravljena je razrjeđivanjem 1,0 mL ekstrakta destiliranom vodom u odmjerne tikvici od 10 mL. Maseni udio fenolnih kiselina, izražen kao ružmarinska kiselina, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ fenolnih kiselina} = A \times 2,5/m,$$

gdje je A - apsorbancija ispitivane otopine na 505 nm, m - masa droge u gramima.

3.3.5 Određivanje flavonoida

Određivanje sadržaja flavonoida u nadzemnim dijelovima istraživanih vrsta roda *Micromeria* provedeno je prema metodi po Christu i Mülleru (Christ i Müller, 1960). Po 1,000 g praškasto usitnjene biljne droge u tikvici je pomiješano s 20 mL acetona, 2 mL 25%-tne kloridne kiseline i 1 mL 0,5%-tne otopine heksametilentetramina te je sadržaj potom zagrijavan 30 minuta na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Hidrolizat je filtriran kroz malo pamuka u odmjernu tikvicu od 100 mL, a ostaci droge u tikvici i na pamuku ponovo su ekstrahirani s 20 mL acetona, zagrijavanjem 10 minuta. Dobivena otopina također je propuštena kroz malo pamuka, a ekstrakcija acetonom ponovljena još dva puta. Sjedinjeni filtrati razrijeđeni su acetonom do 100,0 mL. U lijevak za odjeljivanje preneseno je 20 mL

pripravljenog hidrolizata i pomiješano s 20 mL vode. Sadržaj je izmućkavan najprije s 15 mL etilacetata, a potom još tri puta s po 10 mL etilacetata. Sjedinjeni etilacetatni slojevi isprani su dva puta s po 40 mL vode, propušteni kroz malo pamuka u odmjernu tikvicu od 50 mL te je sadržaj nadopunjen etilacetatom do oznake. Po 10 mL dobivene otopine preneseno je u dvije odmjerne tikvice od 25 mL. U svaku tikvicu dodano je po 0,5 mL 0,5%-tne otopine natrijevog citrata, a samo u jednu tikvicu 2 mL otopine aluminijskoga klorida (2 g aluminijskoga klorida heksahidrata otopljeno u 100 mL 5%-tne metanolne otopine octene kiseline). Potom je sadržaj obiju tikvica nadopunjen do oznake 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline. Nakon 45 minuta, izmjerena je apsorbancija otopine s aluminijskim kloridom u sloju debljine 1 cm na 425 nm. Kao poredbena otopina korištena je otopina bez aluminijskoga klorida. Maseni udio flavonoida, izražen kao kvercetin, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ flavonoida} = A \times 0,772 / m,$$

gdje je A - apsorbancija ispitivane otopine na 425 nm, a m - masa droge u gramima.

3.3.6 Određivanje trjeslovina i ukupnih polifenola

Određivanje sadržaja trjeslovina i ukupnih polifenola u nadzemnim dijelovima istraživanih vrsta roda *Micromeria* provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema Schneideru (Schneider, 1976). Ekstrakcija ispitivanog biljnog uzorka provedena je zagrijavanjem 0,25 g praškasto usitnjene droge s 80 mL 30%-tnim metanola na vodenoj kupelji kroz 15 minuta. Dobiveni ekstrakt ohlađen je pod tekućom vodom, profiltriran u odmjernu tikvicu od 100 mL i razrijeđen 30%-tnim metanolom do 100,0 mL. 2 mL filtrata pomiješano je s 8 mL destilirane vode i 10 mL otopine natrijeva acetata (1,92 g natrijeva acetata trihidrata i 0,34 mL octene kiseline pomiješano je i nadopunjeno destiliranom vodom do 100 mL). Pufer otopina održavala je stalnu pH vrijednost medija (pH=5) koja je optimalna za taloženje trjeslovina. Otopina dobivena na opisani način označena je kao *otopina 1*. 10 mL *otopine 1* mućkano je na mućkalici jedan sat s 50 mg kazeina, nakon čega je filtrirano. Dobiveni filtrat predstavlja *otopinu 2*.

Po 1 mL *otopine 1* i *otopine 2* pojedinačno je pomiješano u odmjerenoj tikvici od 10 mL s 0,5 mL Folinova reagensa i nadopunjeno do oznake s 33%-tnom otopinom natrijeva karbonata dekahidrata. Apsorbancije dobivenih plavih otopina mjerene su na 720 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Vrijednost koju daje *otopina 1* odgovara količini ukupnih polifenola dok razlika vrijednosti dobivenih za *otopinu 1* i *otopinu 2* ukazuje na količinu trjeslovina u ekstraktu.

Za izračunavanje je korišten baždarni pravac taninske kiseline (raspon koncentracija 10-60 µg/mL), a rezultati su prikazani kao maseni udio.

3.3.7 Frakcioniranje biljnih ekstrakata i izolacija fenolnih kiselina i flavonoida

Frakcioniranje biljnih ekstrakata gel filtracijskom kromatografijom

Gel filtracijska kromatografija primijenjena je za frakcioniranje i pročišćavanje kompleksnih biljnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria*. Ukratko, staklena kolona duljine 50 cm i promjera 2 cm napunjena je predhodno u metanolu izbubrenim Sephadex LH-20 gelom prikladnim za pročišćavanje prirodnih produkata koji zbog svoje topljivosti zahtijevaju eluaciju organskim otapalom. Liofilizirani ekstrakt (1 g) otopljen je u 10,00 mL metanola na ultrazvučnoj kupelji pri 40 °C kroz 10 minuta. Dobivena otopina centrifugirana je 10 minuta pri 3000 okretaja. Supernatant je nanesen na pripremljeni stupac, a elucija je provedena metanolom. Skupljane su frakcije ispitivanih biljnih ekstrakata u volumenima po 5 mL. Sastav fenolnih kiselina i flavonoida u odijeljenim frakcijama ispitan je na tankom sloju silikagela 60 F₂₅₄ koristeći smjesu etilacetata, etilmetilketona, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 5:3:1:1. Detekcija je provedena promatranjem kromatograma pod UV svjetlom pri 365 nm nakon prskanja 1%-tnom metanolnom otopinom β-etilaminoestera difenilboratne kiseline (NST) i 5%-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000. Odijeljene frakcije sličnog sastava fenolnih kiselina i flavonoida združene su i podvrgnute daljnjem pročišćavanju koje je izvedeno na stupcu Sephadex LH-20 gela prethodno izbubrenog u smjesi metanola i etilacetata u volumnim omjerima 9:1 u staklenoj koloni duljine 70 cm i promjera 1,5 cm. Frakcije su prije propuštanja kroz kolonu podešene na način da sadrže 10% etilacetata. Elucija je provedena smjesom metanola i etilacetata u volumnim omjerima 9:1.

Ispitivanje flavonoida i fenolnih kiselina u odijeljenim frakcijama tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPTLC)

Ispitivanje sastava frakcija dobivenih gel filtracijskom kromatografijom provedeno je na tankom sloju silikagela 60 F₂₅₄, na koji su u jednu točku nanесeni uzorci (10 µL) i otopine referentnih supstancija (10 µL). Kao pokretne faze korištene su smjesa toluena, etilformijata i mravlje kiseline u volumnim omjerima 5:4:1 (detekcija flavonoidnih aglikona i fenolnih kiselina) i smjesa etilacetata, etilmetilketona, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 5:3:1:1 (detekcija flavonoidnih glikozida i fenolnih kiselina). Detekcija odijeljenih sastavnica

provedena je promatranjem kromatograma pod UV svjetlom pri 365 nm nakon prskanja 1%-tnom metanolnom otopinom β -etilaminoestera difenilboratne kiseline (NST) i 5%-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000 (PEG). Otopine standardnih flavonoidnih aglikona (izosakuranetin, akacetin, luteolin, kvercetin i kemferol), flavonoidnih glikozida (apigenin-7-glukozid, luteolin-5-glukozid, luteolin-7-glukozid, rutin) i fenolnih kiselina (klorogenska i ružmarinska kiselina) pripremljene su otapanjem u metanolu u koncentraciji 0,05% (Wagner i Bladt, 2009; Fecka i Turek, 2008).

Ispitivanje pogodnog eluensa tankoslojnom kromatografijom obrnutih faza

Združene frakcije dobivene gel filtracijskom kromatografijom nanese su na tanki sloj silikagela RP-18 F₂₅₄. Ispitano je devet različitih eluensa u navedenim volumnim omjerima (V/V):

- metanol-voda 1:9; 5:5; 9:1
- acetonitril-voda 2:8; 5:5; 8:2
- tetrahidrofur-voda 1:9; 5:5; 7:3.

Dobiveni kromatogrami promatrani su pod UV svjetlom na 365 nm kako bi se ustanovilo najučinkovitije odjeljivanje sastavnica i odabrao prikladan eluens za postupak vakuum ekstrakcije na čvrstoj fazi.

Odjeljivanje polifenola vakuum ekstrakcijom na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi primijenjena je u svrhu pročišćavanja, frakcioniranja i izolacije bioaktivnih komponenata iz biljnog materijala. Metoda se temelji na vezivanju analita na adsorbens kojim su punjene kolone, a zatim slijedi desorpcija odgovarajućim otapalom. Najčešće se primjenjuje sustav obrnutih faza, gdje je adsorbens nepolaran a pokretne faze su polarne. Za ekstrakciju na čvrstoj fazi korištene su Isolute C8(EC) kolone a postupak je proveden primjenom IST VacMaster sustava koji uz pomoć vakuuma ubrzava eluiranje. Neposredno prije početka ekstrakcije kolone su aktivirane metanolom, a zatim ekvilibrirane prvim eluensom. Odabrane frakcije predhodno su uparene te otopljene u prvom sredstvu za eluiranje. Frakcije su najprije eluirane smjesom metanola i vode u volumnim omjerima 1:9, zatim 5:5 i na kraju 9:1. Sve skupljene podfrakcije uparene su pomoću rotacijskog vakuum uparivača, a njihov sastav provjeren je tankoslojnom kromatografijom visoke djelotvornosti. Silikagel 60 F₂₅₄ korišten je kao adsorbens, a smjesa etilacetata, etilmetilketona, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 5:3:1:1 kao pokretna faza.

Detekcija je provedena promatranjem kromatograma pod UV svjetlom pri 365 nm nakon prskanja NST/PEG reagensom. Sve odijeljene frakcije su liofilizirane.

Preparativna kromatografija na tankom sloju adsorbensa

Preparativna kromatografija na tankom sloju adsorbensa primijenjena je za izolaciju i pročišćavanje fenolnih kiselina i flavonoida iz biljnih ekstrakata. Korištene su kromatografske ploče sa slojem adsorbensa debljine 2 mm na koji su linijski (400 μ L) naneseni uzorci (liofilizirani uzorci prethodno su otopljeni u 1 mL metanola). Razvijanje kromatograma provedeno je smjesom etilacetata, etilmetilketona, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 5:3:1:1 i smjesom etilacetata, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 8:1:1. Nakon razvijanja kromatograma, rubni dio ploče prskan je NST/PEG reagensom. Pod UV svjetlom na 365 nm označene su linijske zone u kojima su bile ukoncentrirane pojedine bioaktivne sastavnice od interesa. Označene zone pažljivo su sastrugane i eluirane metanolom. Smjesa adsorbensa i otopine koja sadrži desorbiranu sastavnicu centrifugirana je 10 minuta na 3000 okretaja, a supernatant ukoncentriran u struji dušika.

3.3.8 Određivanje ružmarinske kiseline metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)

Liofilizirani etanolni ekstrakti (1 mg) nadzemnih dijelova vrsta *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* (poglavlje 3.3.2) pojedinačno su otopljeni u 1,00 mL metanola primjenom ultrazvuka tijekom 10 minuta. Osnovna otopina ružmarinske kiseline pripremljena je u koncentraciji 50 μ g/mL, a injektiranjem različitih volumena osnovne otopine dobivene su koncentracije prikladne za izradu baždarnog dijagrama. Prije injektiranja u instrument sve otopine filtrirane su kroz membranske filtre veličine pora 0,22 μ m. Kvalitativna i kvantitativna analiza ružmarinske kiseline u istraživanim ekstraktima provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti obrnutih faza primjenom instrumenta La Chrom opremljenim DA-detektorom. Odjeljivanje je provedeno u koloni Zorbax SB C-150x21 punjenoj C-18 reverznom fazom, pri temperaturi od 30 °C. Kao pokretna faza korištena je smjesa otapala koja se sastojala od 0,1%-tne otopine mravlje kiseline u vodi (otapalo A), 0,1%-tne mravlje kiseline u metanolu (otapalo B) i 0,1%-tne otopine mravlje kiseline u acetonitrilu (otapalo C). Protok pokretne faze iznosio je 300 μ L/min. Gradijent eluacije prikazan je u Tablici 4a. Ružmarinska kiselina detektirana je na 280 nm, usporedbom retencijskih vremena i UV/Vis spektara. Kvantifikacija je provedena prema baždarnom

dijagramu ovisnosti koncentracije ružmarinske kiseline i površine ispod krivulje, uz korištenje D-7000 HPLC System-Manager programskog paketa.

Tablica 4a. Gradijent otapala za određivanje ružmarinske kiseline u etanolnim biljnim ekstraktima metodom RP-HPLC-DAD

Vrijeme (min)	Otapalo A (udio %)	Otapalo B (udio %)	Otapalo C (udio %)
0	95	3	2
40	0	57	43
41	95	3	2
46	95	3	2

3.3.9 Analiza fenolnih kiselina i flavonoida u vezanom sustavu tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-ESI-MS/MS)

A) Analiza fenolnih kiselina i flavonoida u liofiliziranim etanolnim ekstraktima vrsta roda *Micromeria* provedena je primjenom tekućinskog kromatografa ThermoScientific UltiMate 3000 RS. Korištena je kolona Kinetex C-18 dimenzija 100 x 2,1 mm i promjera zrna punila 2,8 μm . Temperatura kolone iznosila je 30 °C. Kao pokretna faza služila je smjesa otapala koja se sastojala od 0,1%-tne otopine mravlje kiseline u vodi (otapalo A) i 0,1%-tne otopine mravlje kiseline u acetonitrilu (otapalo B). Protok pokretne faze iznosio je 250 $\mu\text{L}/\text{min}$, a gradijent elucije prikazan je u Tablici 4b. Volumen injektiranih uzoraka iznosio je 5 μL . Odijeljene sastavnice detektirane se Thermo Scientific LTQ XL masenim detektorom nakon provedene ionizacije elektroraspršenjem. Protok dušika iznosio je 9 L/min, temperatura 350 °C, pritisak plina 70 U i napon na kapilari 5kV. Svi uzorci analizirani su u negativnom ionizacijskom modu. Za kontrolu instrumenta i obradu podataka korišten je Xalibur programski paket. Sastavnice su identificirane na osnovi rezultata dobivenih za poredbene supstancije i literaturnih podataka.

Tablica 4b. Gradijent otapala za analizu fenolnih kiselina i flavonoida u etanolnim biljnim ekstraktima metodom LC-ESI-MS/MS

Vrijeme (min)	Otapalo A (udio %)	Otapalo B (udio %)
0	94	6
6	86	14
50	40	60
51	94	6
63	94	6

B) Analiza polifenolnih sastavnica u odijeljenim frakcijama etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* je provedena primjenom tekućinskog kromatografa Thermo Finnigan Surveyor korištenjem kolone Zorbax SB C-18 dimenzija 150 x 21 mm i promjera zrna punila 2,8 µm. Temperatura kolone iznosila je 30 °C. Kao pokretna faza služila je smjesa otapala koja se sastojala od 0,1%-tne otopine mravlje kiseline u vodi (otapalo A), 0,1%-tne otopine mravlje kiseline u metanolu (otapalo B) i 0,1%-tne otopine mravlje kiseline u acetonitrilu (otapalo C). Protok pokretne faze iznosio je 400 µL/min, a gradijent eluacije prikazan je u Tablici 4c. Volumen injektiranih uzoraka iznosio je 5 µL. Odijeljene sastavnice detektirane su Thermo Finnigan LCQ Deca Xp masenim detektorom nakon provedene ionizacije elektroraspršenjem. Protok dušika iznosio je 9 L/min, temperatura 350 °C, pritisak plina 70 U i napon na kapilari 5kV. Svi uzorci analizirani su u negativnom ionizacijskom modu. Za kontrolu instrumenta i obradu podataka korišten je Xalibur programski paket. Sastavnice su identificirane na osnovi rezultata dobivenih za poredbene supstancije i literaturnih podataka.

Tablica 4c. Gradijent otapala za za analizu fenolnih kiselina i flavonoida u odijeljenim frakcijama biljnih ekstrakata metodom LC-ESI-MS/MS

Vrijeme (min)	Otapalo A (udio %)	Otapalo B (udio %)	Otapalo C (udio %)
0	95	3	2
40	0	57	43
41	95	3	2
46	95	3	2

3.3.10 Prevalidacija metode spektrofotometrijskog određivanja hidroksicimetnih derivata primjenom programskog paketa ESCULAP

Prevalidacijski eksperimenti temelje se na 24 mjerenja podijeljenih u šest skupina (6 standardnih otopina analita, j), a svaka grupa obuhvaća 4 ponovljena mjerenja (i). Za svako mjerenje standarda izvedena su mjerenja odgovarajuće slijepe probe (24 slijepa mjerenja) i kompenzacijske otopine (24 kompenzacijska mjerenja). Za provjeru valjanosti metode određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata korištena su dva standarda: ružmarinska i klorogenska kiselina. Osnovne otopine ružmarinske i klorogenske kiseline pripremljene su otapanjem 10,00 mg svake kiseline pojedinačno u 100,00 mL metanola. Radne standardne otopine pripremljene su razrjeđivanjem osnovnih otopina. Standardni i slijepi uzorci mjereni su u radnom području 1:10 ($1,0 x_U = x_1 = x_U = 400,00 \mu\text{g}$, gornja granica analita, $0,8 x_U = x_2 = 320,00 \mu\text{g}$, $0,6 x_U = x_3 = 240,00 \mu\text{g}$, $0,4 x_U = x_4 = 180 \mu\text{g}$, $0,2 x_U = x_5 = 80,0 \mu\text{g}$, $0,1 x_U = x_6 = x_L = 40,0 \mu\text{g}$, donja granica analita), prema redoslijedu 1, 6, 2, 5, 3 i 4 (Tablica 5).

Tablica 5. Strategija standardiziranih prevalidacijskih mjerenja ($N= 24$ mjerenja)

Proces dobivanja rezultata	
Tip mjerenja	Slijepa mjerenja (B), gruba mjerenja (y)
Broj analitičkih skupina	$J = 6, j = 1, 2, \dots, 6$
Volumen skupine	$I = IV, i = I, \dots, IV$
Ukupan broj mjerenja	$N = J \times I = 24, n = 1, 2, \dots, 24$
Količina analita	X (izraženo kao količina, masa ili koncentracija)
Radno područje analita	x_U do x_L (x_U i x_L su gornja i donja razina analita): $1,0 x_U = x_1, 0,8 x_U = x_2, 0,6 x_U = x_3, 0,4 x_U = x_4, 0,2 x_U = x_5, 0,1 x_U = x_6 = x_L$
Redoslijed mjerenja unutar grupe	1, 6, 2, 5, 3, 4
Mjera (neto signal)	$S = y - B$
Grubi signal	y
Slijepi signal	B

Mjerenja su izvedena prema metodi za određivanje ukupnih hidroksicimetnih derivata opisanoj u poglavlju 3.3.12. Slijepi uzorci pripremljeni su bez analita i apsorbancija je izmjerena prema propisanoj metodi, dok su kompenzacijski uzorci sadržavali iste količine ružmarinske ili klorogenske kiseline ali bez reagensa. Dobiveni podaci analizirani su korištenjem deskriptivne i prognostičke statistike kako bi se procijenila kvaliteta mjerenja na donjoj granici radnog područja, homogenost podataka te kako bi se prosudile kalibracijske i

analitičke evaluacijske funkcije, otkrilo bjegunce i procijenilo granične vrijednosti. Prevalidacijsku strategiju sa svim zahtjevima i algoritmima koju smo koristili u okviru prevalidacije metode opisali su Grdinić i Vuković (2004), a svi izračuni su napravljeni prema njihovom programu ESKULAP.

3.3.11 Ispitivanje fenolnih kiselina metodom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti (HPTLC) u vrstama porodice Lamiaceae

Po 1 g praškasto usitnjenih cvjetova, listova ili nadzemnih dijelova 32 odabrane biljne vrste porodice Lamiaceae ekstrahirano je 15 minuta s 10 mL metanola na vodenoj kupelji pri 60 °C, uz povratno hladilo. Nakon hlađenja i filtriranja, dobiveni bistri ekstrakti korišteni su kao uzorci za kromatografsko ispitivanje. Otopine poredbenih supstancija (ružmarinska i klorogenska kiselina) pripremljene su otapanjem u metanolu u koncentraciji 0,05% (Wagner i Bladt, 2009).

Ispitivanje fenolnih kiselina provedeno je na tankom sloju silikagela 60 F₂₅₄, na koji su linijski (10 mm duljine) nanoseni uzorci (10 µL) i otopine standarda (5 µL). Kao pokretna faza služila je smjesa diizopropil etera, acetona, vode i mravlje kiseline u volumnim omjerima 5:3:1:1. Detekcija odijeljenih sastavnica provedena je promatranjem kromatograma pod UV svjetlom pri 365 nm nakon prskanja 1%-tnom metanolnom otopinom β-etilaminoestera difenilboratne kiseline (NST) i 5%-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000 (PEG) (Fecka i Turek, 2008).

3.3.12 Primjena prevalidirane metode spektrofotometrijskog određivanja hidroksicimetnih derivata u vrstama porodica Lamiaceae

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih derivata izraženih kao ružmarinska kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u odabranim uzorcima biljnih vrsta porodice Lamiaceae provedena je spektrofotometrijskom metodom koju propisuje Europska farmakopeja (EDQM, 2004). Sva određivanja napravljena su u triplicatu. U 0,200 g praškasto usitnjene biljne droge dodano je 80 mL 50%-tnog etanola i zagrijavano u tikvici s povratnim hladilom na kipućoj vodenoj kupelji 30 min. Nakon hlađenja i filtriranja, filtrat je nadopunjen do 100 mL s 50%-tnim etanolom u odmjernoj tikvici (osnovna otopina). Ispitivana otopina pripremljena je miješanjem 1,0 mL osnovne otopine s 2,0 mL 0,5 M

klorovodične kiseline, 2,0 mL otopine dobivene otapanjem 10 g natrijeva nitrita i 10 g natrijeva molibdata u 100 mL vode te 2,0 mL 8,5 %-tne otopine natrijevog hidroksida. Tikvica je nadopunjena destiliranom vodom do 10,00 mL u odmjernoj tikvici. Kompenzacijska otopina dobivena je razrjeđivanjem 1,0 mL osnovne otopine vodom do 10,0 mL u odmjernoj tikvici. Apsorbancija dobivenih otopina odmah je izmjerena na 505 nm. Maseni udio fenolnih kiselina izračunat je i izražen kao ružmarinska kiselina prema izrazu:

$$\% = A \times 2,5 / m$$

gdje je A - izmjerena apsorbancija na 505 nm; m - masa droge izražena u gramima, a specifična apsorbancija ružmarinske kiseline pri 505 nm iznosi 400.

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih derivata izraženih kao klorogenska kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u odabranim uzorcima biljnih vrsta porodice Lamiaceae provedena je spektrofotometrijskom metodom koju propisuje Europska farmakopeja (EDQMc, 2004). Sva određivanja provedena su u triplikatu. U 0,200 g praškasto usitnjene biljne droge dodano je 80 mL 50%-tnog etanola i zagrijavano u tikvici s povratnim hladilom na kipućoj vodenoj kupelji 30 min. Nakon hlađenja i filtriranja, filtrat je nadopunjen do 100 mL s 50%-tnim etanolom u odmjernoj tikvici (osnovna otopina). Ispitivana otopina pripremljena je miješanjem 1,0 mL osnovne otopine s 2,0 mL 0,5 M klorovodične kiseline, 2,0 mL otopine dobivene otapanjem 10 g natrijeva nitrita i 10 g natrijeva molibdata u 100 mL vode, te 2,0 mL 8,5 %-tne otopine natrijevog hidroksida. Tikvica je nadopunjena destiliranom vodom do 10,00 mL u odmjernoj tikvici. Kompenzacijska otopina dobivena je razrjeđivanjem 1,0 mL osnovne otopine vodom do 10,0 mL u odmjernoj tikvici. Apsorbancija dobivenih otopina odmah je izmjerena na 525 nm. Maseni udio fenolnih kiselina izračunat je i izražen kao klorogenska kiselina prema izrazu:

$$\% = A \times 2,5 / m$$

gdje je A - izmjerena apsorbancija na 525 nm; m - masa droge izražena u gramima, a specifična apsorbancija klorogenske kiseline pri 525 nm iznosi 188.

3.4 Istraživanja bioloških učinaka

3.4.1 Priprema biljnih ekstrakata

Osušeni i praškasto usitnjeni nadzemni dijelovi ispitivanih vrsta roda *Micromeria* (20,00 g) ekstrahirani su s 200 mL 70%-nog etanola na ultrazvučnoj kupelji 30 minuta. Dobiveni ekstrakti filtrirani su preko Whatman br. 1 filter-papira, uz pomoć Büchnerovog lijevka. Biljni materijal koji je zaostao na filter-papiru ponovo je ekstrahiran na gore naveden način. Sjedinjeni filtrati upareni su pomoću rotacijskog vakuum-uparivača pri 50 °C, a dobiveni smolasti ostatak je liofiliziran. Pripremljeni biljni ekstrakti pohranjeni su na -20 °C i korišteni su kao uzorci za biološka ispitivanja.

3.4.2 Materijali

Instrumenti i pribor

- automatske jednokanalne i multikanalne pipete različitih zapremnina (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- centrifuga Jouan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- CO₂ inkubator za uzgoj staničnih kultura Heracell (Heraeus, Hanau, Njemačka)
- epifluorescencijski mikroskop s ekscitacijskim filterom od 515-560 nm (Zeiss, Oberkochen, Njemačka)
- Falcon epruvete od 50 mL (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, SAD)
- Hematološki analizator Sysmex SF300 (Sysmex, Kobe, Japan)
- kadica za elektroforezu Owl™ A3-1 (Thermoscientific, Sunnyvale, SAD)
- komora za sterilni rad MSC-Advantage (Thermoscientific, Sunnyvale, SAD)
- liofilizator (Lab-kits, Hong Kong, Kina)
- mikrotitarske pločice Immulon 2HB s 96 jažica ravnog dna za ELISA-u (Dynex technologies, Ashford, VB)
- mikrotitarske pločice s 96 jažica za uzgoj staničnih kultura (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, SAD)
- multifunkcionalni čitač mikrotitarskih pločica EnVision® Multilabel Reader (PerkinElmer, Waltham, SAD)

- multifunkcionalni čitač mikrotitarskih pločica Wallac 1420 Viktor² (Perkin Elmer, Waltham, SAD)
- plastične posude za uzgoj stanica (Falcon, Becton dickinson, Oxnard, SAD)
- strugač stanica (Falcon Becton Dickinson, Oxnard, SAD)
- termostat (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- uređaj za automatsko pipetiranje JANUS Automated Workstation (PerkinElmer, Waltham, SAD)
- uređaj za doziranje reagensa Multidrop™ Combi Reagent Dispenser (Thermoscientific, Sunnyvale, SAD)
- uređaj za pipetiranje malih volumena Mosquito HTS (TTP Labtech, Hertfordshire, VB)
- uređaj za vakuum ekstrakciju IST VacMaster (Biotage, Uppsala, Švedska)
- UV/VIS Spektrofotometar Helios γ (Spectronic unicam, Cambridge, Velika Britanija).

Reagensi, standardi i ostale kemikalije

- agaroz LMP (*low melting point*) (Invitrogen, Paisley, VB)
- agaroz NMP (*normal melting point*) (Invitrogen, Paisley, VB)
- albumin goveđeg seruma (BSA, *bovine serum albumine*) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- amfotericin B (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- amonijev molibdat (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- askorbinska kiselina 99% (Acors Organics, Geel, Belgija)
- bovericin ≥97% (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- butilhidroksitoluen (BHT) >99% (Fluca, Buchs, Švicarska)
- dimetilsulfoksid (DMSO) (Fluca, Buchs, Švicarska)
- DMEM-dulbecco modificirani Eagle medij (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, SAD)
- DPPH -2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- etanol p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etanol apsolutni p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- eter p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etidij bromid (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA) p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- fenazin metosulfat (PMS) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)

- ferozin (dinatrijeva sol 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4'-disulfonske kiseline) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- ferulična kiselina $\geq 98\%$ (Fluca, Buchs, Švicarska)
- fosfatom puferirana otopina soli (0,01 M, pH 7,4) (PBS, *phosphate buffered saline*) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- galna kiselina $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- izoferulična kiselina $\geq 98\%$ (Fluca, Buchs, Švicarska)
- izovanilnska kiselina $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- kalcijev heksacijanoferat (Merc, Darmstadt, Njemačka)
- kalijev dihidrogenfosfat p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev klorid p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- karbonatni coating pufer (pH 9,6): Na_2CO_3 (Kemika, p.a.) 1,59 g; NaHCO_3 (Kemika, p.a.) 2,93 g; NaN_3 (Sigma-Aldrich, p.a.) 0,2 g u 1000 mL deionizirane vode
- kavena kiselina $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- klorogenska kiselina $\geq 98\%$ (Fluca, Buchs, Švicarska)
- lipopolisaharid iz *Escherichia coli* 011:B4 (LPS) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-5arboksmetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolin) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- natrij acetat p.a. (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- natrij citrat p.a. (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- natrij laurilsarkozin (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- natrijev fosfat dodekahidrat p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidroksid p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev klorid p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- *o*-kumarinska kiselina $\geq 95\%$ (Fluca, Buchs, Švicarska)
- penicilin (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- *p*-hidroksibenzojeva kiselina $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- *p*-kumarinska kiselina $\geq 95\%$ (Fluca, Buchs, Švicarska)
- RPMI hranjivi medij (Imunološki zavod, Zagreb, Hrvatska)
- ružmarinska kiselina $\geq 95\%$ (Fluca, Buchs, Švicarska)
- salicilna kiselina $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- sinapna kiselina $\geq 95\%$ (Fluca, Buchs, Švicarska)

- siringična kiselina $\geq 95\%$ (Fluca, Buchs, Švicarska)
- streptavidin-peroksidaza konjugat (Calbiochem, Frankfurt, Njemačka)
- streptomycin (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- sulfatna kiselina p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- tetrametil-benzidin $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- tiobarbiturna kiselina p.a. (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- trikloroctena kiselina p.a. (Acors Organics, Geel, Belgija)
- tripsin-EDTa otopina (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- tris-HCl pufer (0,1 M, pH 8,0) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- Triton-X-100 (Merc, Darmstadt, Njemačka)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- vanilinska kiselina $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- vodikov peroksid 30% (Merc, Darmstadt, Njemačka)
- željezov (II) klorid (Fluca, Buchs, Švicarska)
- željezov (III) klorid (Riedel-de-Haen, Seelze, Njemačka).

Biološki metrijal

- stanična linija Hep G2 - stanična linija ljudskog karcinoma jetre ATCC HB-8065 (*American Type Culture Collection*, Manassas, SAD)
- stanična linija THP 1 - ATCC TIB-202 (*American Type Culture Collection*, Manassas, SAD)
- izolirani splenociti Balb/C miševa
- uzorak humane periferne krvi

Protutijela i standardi

- mišje biotinizirano pročišćeno protutijelo (IgG) usmjereno protiv IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, SAD).
- mišje monoklonsko protutijelo (IgG) usmjereno protiv IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, SAD).

3.4.3 Istraživanje antioksidacijskog djelovanja

3.4.3.1 Priprema uzoraka i standarda

U svrhu istraživanja antioksidacijskog potencijala hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina te ekstrakata vrsta roda *Micromeria* pripremljene su matične otopine navedenih ispitivanih kiselina i liofiliziranih biljnih ekstrakata u etanolu. Ispitivani koncentracijski nizovi pripremljeni su dvostrukim serijskim razrjeđivanjem. Na isti način su pripremljene otopine standarda: ružmarinske kiseline, butilhidroksitoluena (BHT), etilendiamin tetraoctene kiseline (EDTA), rutina i askorbinske kiseline.

3.4.3.2 Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala

Antiradikalna aktivnost fenolnih kiselina i etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* određena je spektrofotometrijskom metodom prema Bloisu (Blois, 1958). Pripremljena je 0,1 mM otopina DPPH radikala otapanjem 4,00 mg u 100 mL 96%-tnog etanola. Priređen je koncentracijski niz (100-0,19 µg/mL) ispitivanih fenolnih kiselina i ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Micromeria* (160-0,63 µg/mL) u etanolu. U epruvete s 3,00 mL ispitivanih otopina dodano je po 1,00 mL otopine DPPH radikala te je sadržaj snažno promućkan. U svrhu inkubacije, epruvete su zatim ostavljene 30 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićene od svjetlosti. Apsorbancija ispitivanih otopina izmjerena je na valnoj duljini od 517 nm, uz etanol kao slijepu probu. Niža vrijednost apsorbancije upućivala je na veći antiradikalni učinak. Postotak inhibicije DPPH radikala izračunat je prema izrazu:

$$I (\%) = (A_k - A_u/A_k) \times 100,$$

gdje je A_u - apsorbancija ispitivanog uzorka, a A_k - apsorbancija kontrolne otopine koja sadrži sve reagense osim ispitanog uzorka. Sva su mjerenja provedena u triplicatu. Koncentracija ispitivanih uzoraka koje su uzrokovale inhibiciju 50% ukupno prisutnih DPPH radikala (EC_{50}) određene su linearnom interpolacijom iz odnosa učinka i koncentracije.

3.4.3.3 Određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta

Ukupni antioksidacijski kapacitet fenolnih kiselina i etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* određen je spektrofotometrijskom metodom prema Prieto i suradnicima (Prieto i sur., 1999). Koncentracijski niz ispitivanih kiselina (200-12,5 µg/mL) i biljnih ekstrakata (80-10 µg/mL) priređen je u etanolu. U epruvete s 0,3 mL ispitivanih otopina dodano je 2,7 mL otopine reagensa koji je sadržavao 0,6 M sulfatnu kiselinu, 28 mM natrijev fosfat i 4 mM amonijev molibdat. Epruvete s ispitivanim otopinama su zatim inkubirane u vodenoj kupelji na 95°C tijekom 90 minuta. Nakon što je sadržaj ohlađen na sobnu temperaturu, izmjerena je apsorbancija dobivenih zelenih otopina na valnoj duljini od 695 nm. Kao slijepa proba korištena je smjesa 0,3 mL etanola i 2,7 mL otopine reagensa. Slijepa proba je inkubirana pod istim uvjetima kao i ispitivane otopine. Ukupni antioksidacijski kapacitet ispitivanih uzoraka izražen je kao ekvivalent vitamina C. U tu svrhu pripremljen je niz otopina vitamina C (100-0,78 µg/mL) koje su testirane na gore opisan način, te je na temelju dobivenih vrijednosti apsorbancija napravljen baždarni pravac koji je korišten za izračun. Sva mjerenja provedena su u triplicatu.

3.4.3.4 Određivanje sposobnosti redukcije

Sposobnost fenolnih kiselina i etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* da reduciraju ione željeza(III) određena je spektrofotometrijskom metodom (Gülçin, 2006). Priređen niz ispitivanih uzoraka u etanolu bio je u koncentracijskom rasponu od 100 µg/mL do 0,19 µg/mL za kiseline i od 80 µg/mL do 0,625 µg/mL za ekstrakte. U epruvetu s 1 mL ispitivane otopine uzorka određene koncentracije dodano je 2,5 mL fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6) te 2,5 mL 1%-tne otopine kalijevog heksacijanoferata. Reakcijska smjesa inkubirana je 20 minuta na 50 °C. Potom je u smjesu dodano 2,5 ml 10%-tne otopine trikloroctene kiseline i sadržaj je centrifugiran 10 minuta. Nakon centrifugiranja, 2,5 mL gornjeg sloja pomiješano je s 2,5 mL destilirane vode i 0,5 mL 0,1%-tne otopine željezovog(III) klorida. Apsorbancija dobivene zelenoplave otopine izmjerena je na 700 nm, uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Viša vrijednost apsorbancije ukazivala je na veću moć redukcije. Postupak je proveden u triplicatu. Koncentracija ispitivanog uzorka koja je uzrokovala apsorbanciju od 0,5 i koja odgovara 50%-tnoj redukcijskoj sposobnost (EC50) određena je linearnom interpolacijom iz odnosa izmjerenih vrijednosti apsorbancija i pripadajućih koncentracija ispitivanih uzoraka.

3.4.3.5 Određivanje sposobnosti keliranja iona željeza

Sposobnost keliranja iona željeza(II) za fenolne kiseline i etanolne ekstrakte vrsta roda *Micromeria* određena je spektrofotometrijskom metodom prema Gülçinu (Gülçin, 2006). Priređen niz ispitivanih uzoraka u etanolu bio je u koncentracijskom rasponu od 3200 µg/mL do 1,56 µg/mL za fenolne kiseline i 640 µg/mL do 20 µg/mL za ekstrakte. U epruvete s 400 µL ispitivane otopine dodano je 50 µL 2 mM željezovog(II) klorida i 3,35 mL etanola. Nakon 5-minutne inkubacije na sobnoj temperaturi, reakcija je potaknuta dodatkom 200 µL 5mM ferozina. Sadržaj epruvete je snažno promućkan i ostavljen stajati 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancija dobivenih ružičastih otopina izmjerena je na valnoj duljini od 562 nm, uz etanol kao slijepu probu. Usporedno je testirana EDTA kao referentni kelator. Postotak inhibicije formiranja ferozin-Fe²⁺ kompleksa, odnosno učinak keliranja metalnih iona, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ keliranja iona željeza} = [A_k - (A_u - A_0)] / A_k \times 100,$$

gdje je A_u - apsorbancija ispitivane otopine, A_k - apsorbancija kontrolne otopine koja je umjesto testiranog uzorka sadržavala jednaku količinu otapala (etanola), a A_0 - apsorbancija otopine testiranog uzorka bez dodatka otopine željezovog(II) klorida. Postupak je proveden u triplicatu. Koncentracije ispitivanih uzoraka koje su uzrokovale keliranje 50% ukupno prisutnih iona željeza (EC_{50}) određene su linearnom interpolacijom iz odnosa učinka i koncentracije.

3.4.4 Istraživanje citotoksičnog djelovanja

3.4.4.1 Priprema ispitivanih uzoraka

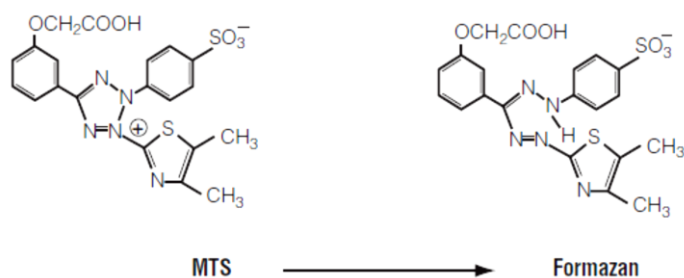
U svrhu testiranja citotoksičnog djelovanja pripremljene su 2M otopine hidroksibenzojevih kiselina i hidroksicimetnih kiselina u DMSO-u. Otopine liofiliziranih etanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova vrsta *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* pripremljene su također otapanjem u DMSO-u u koncentraciji 300 mg/mL. Osnovne otopine razrjeđivane su RPMI 1640 medijem tako da je su fenolne kiseline podvrgnute ispitivanju u padajućem koncentracijskom nizu od 4000 µM do 31,25 µM, dok su ispitivane koncentracije za ekstrakte bile u rasponu od 600 µg/mL do 4,6 µg/mL.

3.4.4.2 Priprema staničnih kultura

Za ispitivanje citotoksičnog učinka korištene su stanične linije humanog hepatocelularnog karcinoma (HepG2) i stanične linije humane monocitne leukemije (THP 1). Rad sa staničnim kulturama odvijao se u komori za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka. Sve korištene otopine, puferi i hranjivi mediji bili su također sterilni. Stanice su uzgajane u standardnim, sterilnim uvjetima u plastičnim bocama za stanične kulture u inkubatoru pri 37 °C, u struji zraka relativne vlažnosti 95% te 5% CO₂. HepG2 i THP 1 stanične linije uzgajane su u RPMI 1640 mediju obogaćenom 10% fetalnim goveđim serumom, uz dodatak smjese penicilin/streptomycin/amfotericin B. Stanice HepG2 rasle su adherirane u jednom sloju, a s podloge su skidane tripsiniziranjem (prekrivanje stanica dodatkom 6 mL tripsina i termostatiranje 5-8 minuta da se omogući skidanje stanica). Zatim je dodan RPMI 1640 hranjivi medij sa serumom koji inaktivira tripsin. Stanice su zatim presađene 2-3 puta, kako bi konstantno bile u fazi brzog rasta. Stanice THP 1 rasle su u suspenziji i također su presađivane su 2-3 puta. Adherentne HepG2 stanice odvojene su sa čvrste podloge, a stanice u suspenziji direktno su prenesene u Falcon epruvete. Obje stanične linije centrifugirane su 10 min na 1100 okretaja i resuspendirane u RPMI 1640 hranjivom mediju nakon čega su izbrojene direktno na brojaču stanica. Razrjeđivanjem u hranjivom mediju broj stanica podešen je u skladu s potrebama pokusa.

3.4.4.3 Određivanje citotoksičnog učinka MTS testom

Za određivanje citotoksičnosti fenolnih kiselina i biljnih ekstrakata korišten je MTS test u kojem se citotoksični učinak ispitivanih supstancija određuje pomoću tetrazolij soli MTS-a (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) i reagensa za hvatanje elektrona PMS-a (fenazin metosulfat) prema metodi po Mosmannu (Mosmann, 1983). U metabolički aktivnim stanicama MTS se pomoću enzima suksinat-dehidrogenaze prevodi u formazan (Slika 8), spoj koji je topljiv u hranjivom mediju, a ovu kemijsku reakciju vidimo kao promjenu boje iz žute u ljubičastu.



Slika 8. Strukture MTS tetrazolium soli i produkta reakcije formazana

MTS-test proveden je u mikrotitarskim pločicama u koje je dodano 50 μL suspenzije stanica, 50 μL ispitivane supstance i 20 μL reagensa (MTS/PMS). Zatim su pločice inkubirane 2 sata pri 37 $^{\circ}\text{C}$ u struji zraka relativne vlažnosti 95% i 5% CO_2 . Tijekom inkubacije razvila se ljubičasta boja formazana čija je apsorbancija mjerena na mikročitaču pločica na 490 nm. Koncentracija formazana direktno je proporcionalna broju živih stanica u ispitivanim uzorcima. Određivanja su provedena u triplikatu.

3.4.5 Istraživanje protuupalnog djelovanja

3.4.5.1 Priprema ispitivanih uzoraka

Osnovne 2M otopine hidroksibenzojevih kiselina i hidroksicimetnih kiselina pripremljene u DMSO-u. Razrjeđivanjem liofiliziranih etanolnih ekstrakata nadzemnih dijelova biljnih vrsta *Micromeria croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* u istom otapalu dobivene su osnovne koncentracije od 300 mg/mL. Za daljnje ispitivanje otopine su razrjeđivane DMEM medijem. Ispitivane koncentracije fenolnih kiselina bile su u padajućem nizu od 2000 μM do 125 μM , dok su za ekstrakte iznosile od 300 $\mu\text{g/mL}$ do 18,75 $\mu\text{g/mL}$. Krajnja koncentracija otapala (DMSO) tijekom svih pokusa iznosila je 0,10%. Kako bi se isključio utjecaj otapala na određivanje protuupalnog djelovanja, razrjeđenja čistog DMSO-a u mediju podvrgnuta su usporednom ispitivanju.

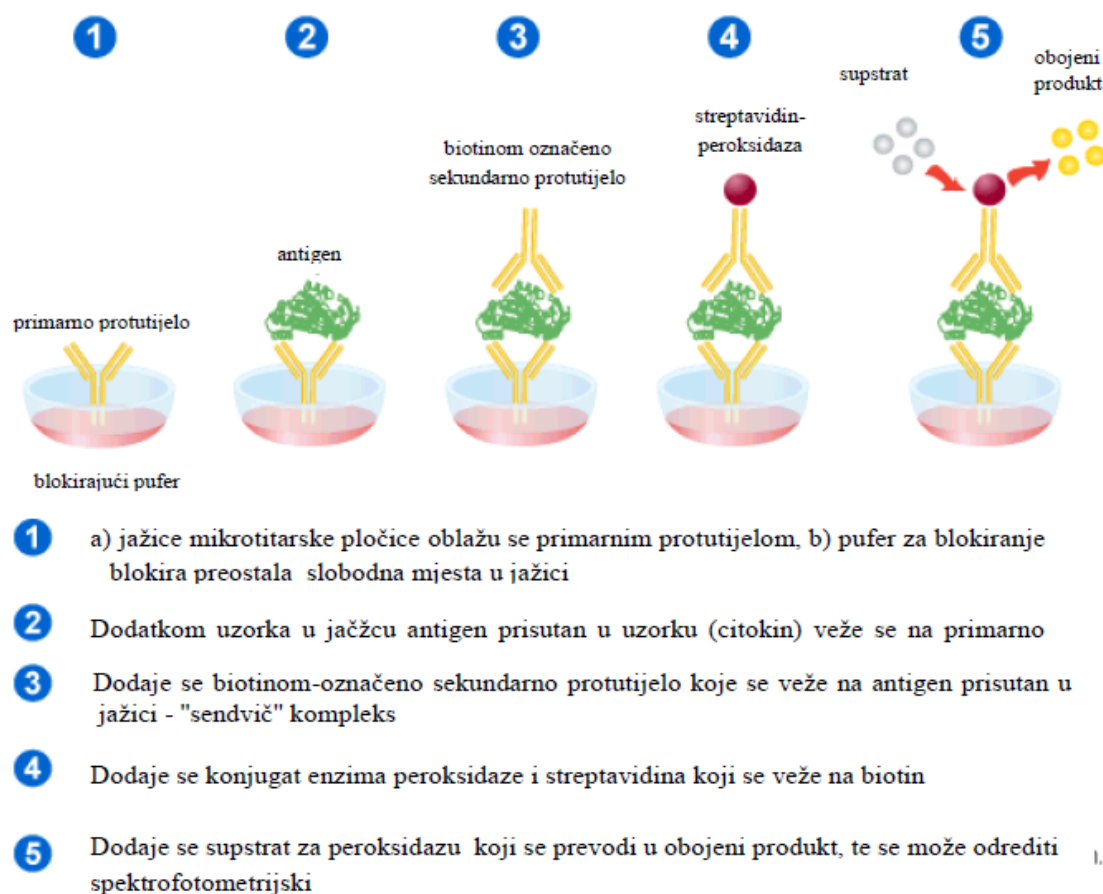
3.4.5.2 Priprema stanica mišjih splenocita

Za istraživanje protuupalnog učinka fenolnih kiselina i biljnih ekstrakata korišteni su splenociti Balb/C miševa. Korišteni su mužjaci mlađi od 2,5 mjeseci i mase 18-20 g koji su boravili u metalnim kavezima pri 12-satnom noć/dan ciklusu, sa slobodnim pristupom hrani i vodi. Žrtvovani su cervikalnom dislokacijom te im je uklonjena slezena koja je zatim pohranjena u DMEM medij. Nakon uklanjanja medija dekantiranjem, dodana je 10%-tna otopina govedeg seruma u DMEM-u te je laganim gnječenjem slezena napravljena suspenzija splenocita. Medij je uklonjen dekantiranjem, a suspenzija splenocita filtrirana kroz sito za stanice i isprana 10%-tnim serumom u DMEM mediju dok na situ nije preostalo samo međustanično tkivo. Suspenzija splenocita centrifugirana je 20 minuta na 1500 rpm pri temperaturi od 15 °C, supernatant je dekantiran te su splenociti resuspendirani PBS-om i ultračistom vodom (dolazi do hemolize eritrocita zbog hipotoničnosti otopine). Suspenzija je nadopunjena svježim medijem i centrifugirana 20 minuta na 1500 rpm pri temperaturi od 15 °C, supernatant je dekantiran i stanice su resuspendirane u 10,00 mL medija. Neposredno prije provođenja pokusa, provedeno je brojanje stanica pomoću hematološkog analizatora. Konačna koncentracija stanica podešena je na 6×10^6 stanica/mL. Cjelokupni rad sa stanicama odvijao se u komori za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka. Sve korištene otopine, puferi i hranjivi mediji su bili također sterilni.

3.4.5.3 Određivanje protuupalnog učinka ELISA metodom

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) je imunoenzimska metoda koja se temelji na reakciji antigen-antitijelo, a provodi se na dalje opisani način. Na dno jažica mikrotitarske pločice za ELISA-u postave se primarna protutijela. Plastični materijali od kojih su napravljene pločice obično imaju slobodne aldehidne skupine koje omogućuju vezanje amino skupina i time čvrsto vezanje primarnih protutijela. Inkubiranjem pločica s proteinima bogatim otopinama, ali bez imunoglobulina (BSA – albumin iz seruma goveda, bezmasno mlijeko, želatina), osigurava se blokiranje slobodnih područja jažica koja nisu vezala primarna protutijela. Na taj način smanjuje se nespecifično vezanje i pojačava osjetljivost i specifičnost analize. Na njih se doda supernatant, odnosno analitički uzorak u kojem se određuju citokini. Ako su u supernatantu prisutni slobodni citokini, oni će se vezati na primarna protutijela. Nakon ispiranja pločica (najčešće fosfat puferiziranom fiziološkom otopinom s dodatkom emulgatora kao što je Tween-20), na jažici ostaju vezani kompleksi

primarnih protutijela s analitom (citokini). Dodatkom specifičnih sekundarnih protutijela, ona se vežu na analit. Na taj način nastaju kompleksi koji se često uspoređuju sa sendvičima jer se analit nalazi između dva protutijela. Zbog toga se ova metoda naziva i „sendvič“ ELISA. Sekundarna protutijela na sebi najčešće imaju vezan biotin na koji se veže konjugat enzima (alkalna fosfataza, peroksidaza, kolin estaraza) i streptavidina ili avidina. Nakon dodatka konjugiranog enzima, inkubacije i ispiranja, u jažice se dodaje supstrat enzima te se razvija boja čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji vezanih citokina. Reakcija se zaustavlja dodatkom „stop otopine“ (sulfatna kiselina), a zatim se intenzitet obojenja mjeri spektrofotometrijski (Slika 9).



Slika 9. Shematski prikaz ELISA metode
(preuzeto s http://www.leinco.com/sandwich_elisa)

Određivanje učinka fenolnih kiselina i biljnih ekstrakata na produkciju citokina IL-6 provedeno je na splenocitima Balb/C miševa. Osnovne otopine ekstrakata i kiselina razrijeđene su u DMEM mediju na koncentraciju 2000 μ M za kiseline i 300 μ g/mL za ekstrakte. Uzorci su potom u triplicatu preneseni na mikrotitrarske pločice s 96 jažica te su

serijski razrijeđeni istim medijem. U jažice predviđene za pozitivnu i negativnu kontrolu otpipetirano je 100 μL razrijeđenog DMSO-a, a zatim je u sve jažice dodano 50 μL suspenzije splenocita koncentracije 6×10^6 stanica/mL. Mikrotitarske pločice su preinkubirane 2 sata u CO_2 inkubatoru pri 37 °C u uvjetima 90% relativne vlažnosti i 5% CO_2 . U jažice je potom dodano 50 μL otopine lipopolisaharida (stimulator produkcije IL-6) tako da je konačna koncentracija lipopolisaharida iznosila 1 $\mu\text{g/mL}$, uz izuzetak onih jažica koje su služile kao negativna kontrola, gdje je umjesto 50 μL LPS otpipetirano 50 μL medija. Ukupan volumen u jažicama iznosio je 200 μL . Tako pripremljene mikrotitarske pločice vraćene su u CO_2 inkubator preko noći. Određivanje slobodnih citokina IL-6 u supernatantu stimuliranih stanica provedeno je metodom „sendvič“ ELISA-e. Immulon 2HB pločice za ELISA-u kotirane su primarnim protutijelima razrijeđenim u karbonatnom puferu za kotiranje. U jažicu je otpipetirano 100 μL tako pripremljene otopine, pa je konačna koncentracija primarnog protutijela u jažici iznosila 1 $\mu\text{g/mL}$. Pločice su inkubirane preko noći pri 4 °C kako bi se osiguralo vezanje primarnog protutijela na jažice. Nakon ispiranja pločica s PBS-Tween-20 puferom, pločice su blokirane dodavanjem 200 μL 1%-tne otopine goveđeg serumskog albumina (BSA) s 5% saharoze u PBS-Tween-20 puferu, uz jednosatnu inkubaciju na 60 °C. Pločice su zatim isprane PBS-Tween-20 puferom, u njih su dodani uzorci, a zatim su inkubirane 1 sat pri 37 °C. Nakon ispiranja pločice PBS-Tween-20 puferom, na pločicu je dodano 100 μL biotiniliranog protutijela u finalnoj koncentraciji 200 ng/mL (otopljeno u 1%-tnoj otopini BSA u PBS-Tween-20 puferu) te je provedena inkubacija u trajanju od 45 minuta pri 37 °C. Pločice su ponovno isprane PBS-Tween-20 puferom te je dodan streptavidin konjugiran s peroksidazom hrena (HRP) u konačnoj koncentraciji 50 ng/mL (otopljen u 10%-noj otopini BSA) te je ostavljen reagirati 30 minuta na 37 °C. Pločice su zatim isprane PBS-Tween-20 puferom, a vezani enzim je vizualiziran dodatkom 100 μL supstrata koji se sastojao od 18 mL ultračiste vode, 2 mL citrat acetatnog pufera, 200 μL dimetilsulfoksidne otopine tetrametil benzidina i 2,5 μL 30%-tnog vodikovog peroksida, pri čemu je nastalo plavo obojenje. Reakcija je zaustavljena dodavanjem „stop otopine“ (1M sulfatna kiselina). Apsorbancija nastalog žutog obojenja izmjerena je na 450 nm. Budući da je intenzitet razvijene boje proporcionalan koncentraciji citokina, postotak inhibicije stvaranja citokina izračunat je prema slijedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = [1 - (\text{koncentracija IL-6 u uzorku} - \text{koncentracija IL-6 negativne kontrole}) / (\text{koncentracija IL-6 pozitivne kontrole} - \text{koncentracija IL-6 negativne kontrole})] \times 100.$$

Utjecaj istraživanih fenolnih kiselina i biljnih ekstrakata na produkciju IL-6 praćen je u odnosu na pozitivnu kontrolu koju su činile stanice stimulirane LPS-om koje nisu bile preinkubirane s ispitivanim uzorcima, dok su negativnu kontrolu predstavljale stanice koje nisu bile preinkubirane s ispitivanim uzorcima niti stimulirane LPS-om.

3.4.5.4 Određivanje citotoksičnog učinka na mišjim splenocitima MTS testom

Za određivanje citotoksičnosti fenolnih kiselina i biljnih ekstrakata korišten je MTS test u kojem se citotoksični učinak ispitivanih supstancija određuje pomoću tetrazolij soli MTS-a (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) i reagensa za hvatanje elektrona PMS-a (fenazin metosulfat) prema metodi po Mosmannu (Mosmann, 1983), a postupak je detaljno opisan u poglavlju 3.4.4.3

3.4.6. Istraživanje antigenotoksičnog djelovanja

3.4.6.1 Priprema ispitivanih uzorka

Pripremljene su matične otopine fenolnih kiselina koncentracije 1 mg/mL, etanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Micromeria* koncentracije 10 mg/mL u DMSO-u te otopina bovericina koncentracije 1mg/mL u apsolutnom etanolu. Iz matičnih otopina fenolnih kiselina i biljnih ekstrakata pripremljene su ispitivane koncentracije. Propisani volumeni testiranih fenolnih kiselina i ekstrakata pomiješalni su s razrijeđenom humanom krvi i tretirani bovericinom tako da su konačne testirane koncentracije iznosile 10 µg/mL za fenolne kiseline i 100 µg/mL za biljne ekstrakte. Krajnja koncentracija otapala (DMSO) tijekom svih pokusa iznosila je 1%. Kao negativna kontrola korištena je 1%-tna otopina DMSO-a u RPMI 1640 mediju, dok je pozitivna kontrola bio 1 µM bovericin. Stanice humane krvi inkubirane su 1 sat s ispitivanim uzorcima (10 µg/mL fenolne kiseline i 100 µg/mL biljni ekstrakti), a zatim je dodana otopina bovericina te inkubacija nastavljena još 1 sat.

3.4.6.2 Priprema uzorka humane krvi

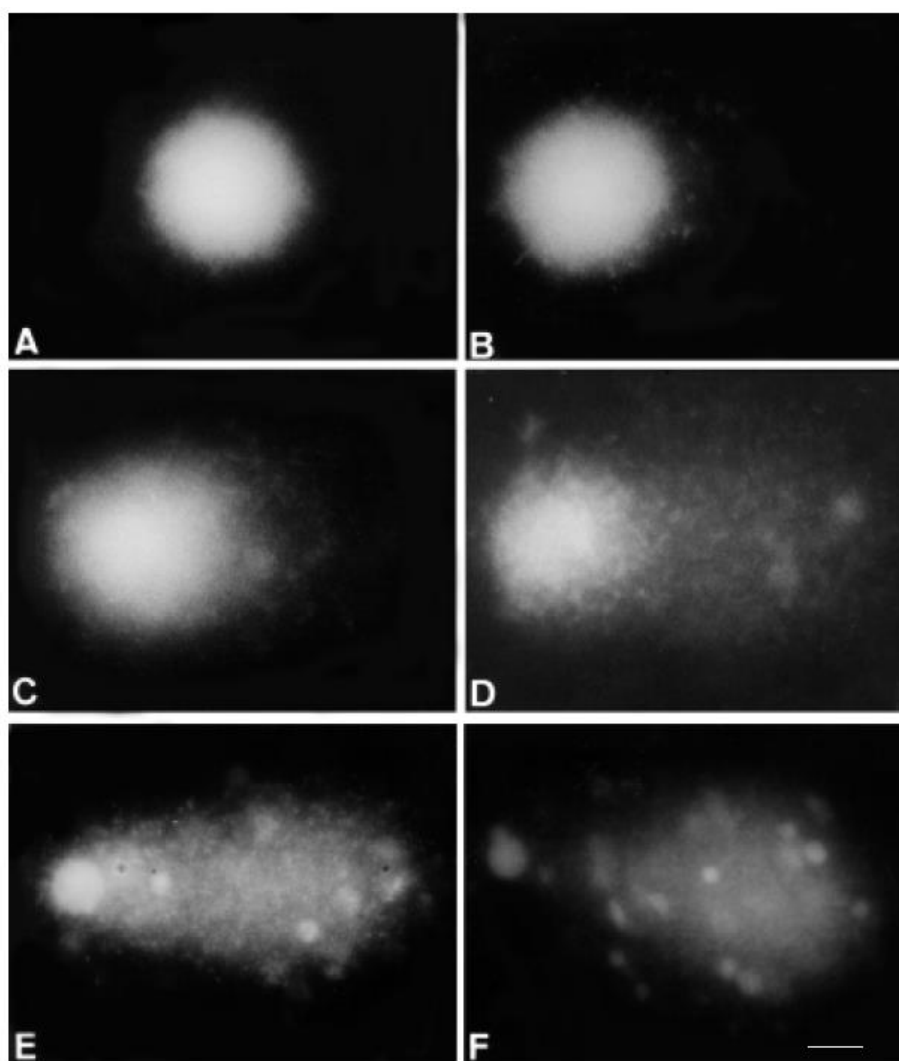
U ispitivanju je korišten venepunkcijom dobiven uzorak pune krvi muškog dobrovoljca, nepušača. Volumen od 10 mL pune krvi pomiješan je s RPMI 1640 hranjivim medijem u omjeru 1:1 te korišten za daljnja ispitivanja.

3.4.6.3 Ispitivanje antigenotoksičnog učinka komet testom

Komet test proveden je prema opisanom protokolu kako slijedi. Predmetna stakalca pripremaju se za izvođenje pokusa uranjanjem u koncentrirani etanol (30 minuta), a potom u eter kroz pola sata. Tako odmašćena i suha stakalca uranjaju se u svježe pripremljenu otopinu vruće 1%-tne NMP (*normal melting point*) agaroze. Stakalca se ostave 24 sata na sobnoj temperaturi kako bi se agarozna polimerizirala i adsorbirala na stakalca. Pomiješa se 20 μ L suspenzije tretirane krvi i 100 μ L LMP (*low melting point*) agaroze. Na pripremljena stakalca nanosi se 100 μ L te smjese, pokrije pokrovnim stakalcem i ostavi polimerizirati 10 minuta na ledu. Nakon uklanjanja pokrovnice, preparati se drže u puferu za lizu (napravljenom neposredno prije uporabe) najmanje 1 sat do 5 dana na 4 °C, u uspravnom košiću zaštićenom od svjetlosti. Nakon lize staničnih struktura, preparati se urone u svježe napravljeni hladni pufer za denaturaciju i ostave 20 minuta u uspravnom košiću zaštićenom od svjetlosti. Ostatak neiskorištenog hladnog pufera za denaturaciju pH 13 stavi se u kadnicu za horizontalnu elektroforezu koja se provodi 20 minuta pri jakosti struje 300 mA i naponu 25 V. Nakon elektroforeze preparati se ispiru tri puta po 5 minuta u Tris-u pH 7,4 a zatim ostave u mraku u vlažnoj komori na 4 °C do bojanja. Nakon ispiranja, preparati se boje pomoću 100-250 μ L etidij-bromida, 10 minuta, uz pokrovnicu. Po potrebi preparate se može još jednom isprati tris-puferom, vratiti pokrovnicu i radi stabilizacije boje držati preparate u mraku, u vlažnoj komori 10-tak minuta. Zatim se pristupa analizi preparata pomoću epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filterom od 510-560 nm.

Tijekom elektroforeze mali fragmenti DNA koji su nastali jednolančanim ili dvolančanim lomovima putuju prema anodi kroz pore gela, dok glavnina DNA zbog velike molekularne mase nema tu sposobnost. Kraći fragmenti putuju brže pa zbog razlike u njihovoj duljini i brzini kretanja dolazi do razdvajanja prema veličini. Nakon bojenja fluorescencijskom bojom, molekula DNA i obrasci putovanja njezinih fragmenata vidljivi su pod mikroskopom kao kometi, po čemu je i test dobio ime.

Na Slici 10 prikazani su različiti stupnjevi oštećenja stanice. Mjerenja dužine repa, repnog intenziteta i repnog momenta provedena su pomoću programa za analizu slike Comet Assay II. Za svaki uzorak izmjereno je 150 kometa. Dužina repa mjerena je od središta jezgre, a izmjerene vrijednosti izražene su u mikrometrima. Repni moment izračunat je primjenom računalnog programa za analizu slike.



Slika 10. Klasifikacija oštećenja stanica u komet-testu

A - neoštećene stanice; B - D - različiti stupnjevi oštećenja stanice; E - maksimalno oštećenje stanice; F - apoptotična stanica

(Preuzeto iz: da Silva J, de Freitas TRO, Marinho JR, Speit G, Erdtmann B. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet Mol Biol* (2000) 23: 241-245.)

3.5 Statistička analiza

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je Microsoft Exel 2007 (Microsoft, Seattle, SAD). Izračunate su aritmetičke sredine i standardne devijacije dobivenih vrijednosti. Koncentracije uzoraka koje ostvaruju 50%-tni učinak (IC_{50}) dobivene su interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.

Rezultati dobiveni komet testom (dužina repa, repni intenzitet i repni moment) izraženi su kao srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama i standardnom pogreškom aritmetičke sredine, minimalne i maksimalne vrijednosti te kao medijani s 25-tim percentilom i 75-tim percentilom. Kolmogorov-Smirnov test je primijenjen za testiranje normalnosti distribucije navedenih mjerenja. Ukoliko je pokazana nenormalna distribucija, mjerenja su logaritamski transformirana i ponovo testirana na normalnost distribucije. Kod normalno distribuiranih vrijednosti za statističku analizu značajnosti razlike između kontrolnih i tretiranih stanica primijenjena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i Tukey post test multiple komparacije, dok je za nenormalno distribuirane primijenjen Kruskal-Wallis test, uz Dunn test multiple komparacije. Kometni parametri su klasificirani i prema 95-toj percentili (AST, *Abnormal size tails*) u kontroli. Dobivene AST vrijednosti statistički su analizirane primjenom Pearsonovog χ^2 – kvadrat testa. Razina značajnosti $p < 0,05$ uzet je kao statistički značajna razlika za sve provedene statističke analize.

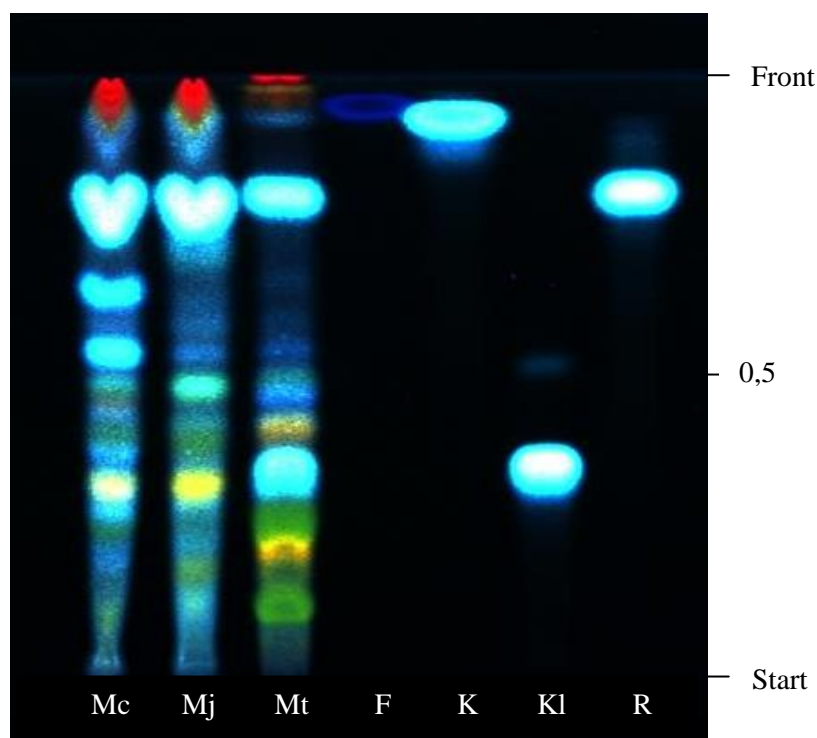
4 REZULTATI I RASPRAVA



4.1 Fitokemijski sastav vrsta roda *Micromeria*

4.1.1 Prisutnost fenolnih kiselina i flavonoida u vrstama roda *Micromeria*

Dokazivanje prisutnosti fenolnih kiselina i flavonoida u etanolnim ekstraktima vrsta *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* provedeno je tankoslojnom kromatografijom. Kao pokretne faze korištene su smjese otapala prikladne za odjeljivanje pojedinih skupina polifenola. Na tankom sloju silikagela fenolne kiseline odijeljene su primjenom pokretne faze diizopropileter-aceton-voda-mravljja kiselina 5:3:1:1 (V/V/V/V), a dobiveni kromatogram prikazan je na Slici 11. Ružmarinska ($R_F = 0,81$) i klorogenska kiselina ($R_F = 0,36$) detektirane u svim ispitanim ekstraktima, a prema intenzitetu svijetloplave fluorescencije pripadajućih zona pretpostavljen je njihov različit sadržaj u ispitivanim biljnim vrstama. Prisutnost kavene kiseline ($R_F = 0,94$) dokazana je u vrstama *M. croatica* i *M. juliana*, dok je feruličnu kiselinu ($R_F = 0,97$) sadržavao jedino ekstrakt vrste *M. thymifolia*.



Slika 11. Kromatogram fenolnih kiselina u odabranim vrstama roda *Micromeria*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC ploča

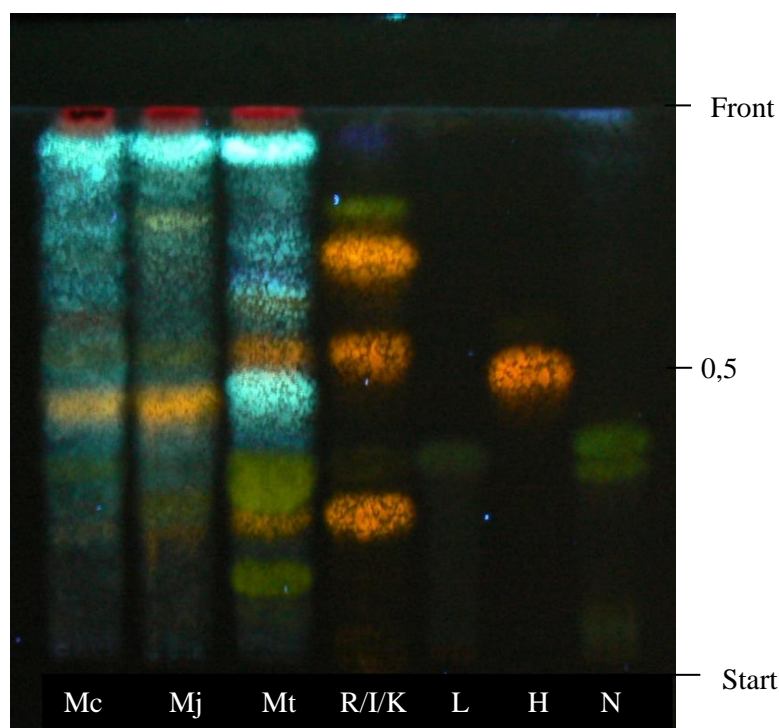
Pokretna faza: diizopropileter-aceton-mravljja kiselina-voda 5:3:1:1 (V/V/V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV 365 nm

Etanolni biljni ekstrakti: Mc - *M. croatica*, Mj - *M. juliana*, Mt - *M. thymifolia*

Poredbene fenolne kiseline: F - ferulična, K - kavena, Kl - klorogenska, R - ružmarinska

Na Slici 12 prikazani su rezultati odjeljivanja flavonoidnih glikozida u etanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Micromeria* primjenom pokretne faze etilacetat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V). Prisutnost flavonoida dokazana je u svim ispitanim ekstraktima. Narančasto fluorescirajuće zone koje su odgovarale rutinu ($R_F = 0,30$) i izokvercitrinu ($R_F = 0,58$) detektirane su u vrsti *M. thymifolia*. Također je ustanovljeno da navedeni ekstrakt sadrži i linarin detektiran kao zona zelene fluorescencije R_F -vrijednosti 0,38.



Slika 12. Kromatogram flavonoidnih glikozida u odabranim vrstama roda *Micromeria*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC ploča

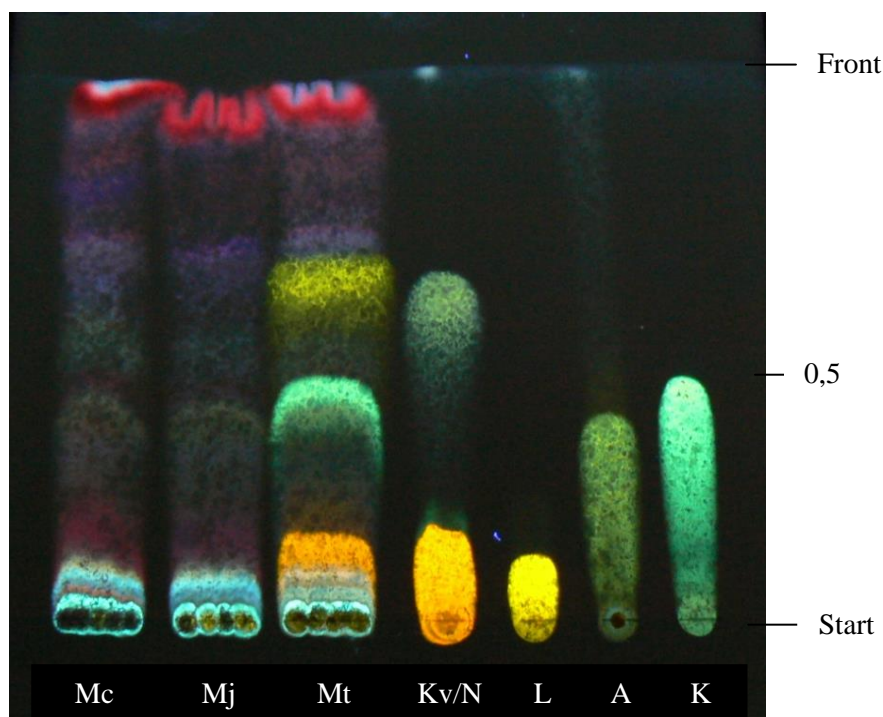
Pokretna faza: etilacetat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV 365 nm

Etanolni biljni ekstrakti: Mc - *M. croatica*, Mj - *M. juliana*, Mt - *M. thymifolia*

Poredbeni flavonoidi: R/I/K - rutin/izokvercitrin/kvercitrin, L - linarin, H - hiperozid,
N - naringin

Primjenom smjese kloroforma i etilacetata u volumnim omjerima 6:4 provedeno je odjeljivanje flavonoidnih aglikona iz etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Micromeria* (Slika 13). U vrstama *M. croatica* i *M. juliana* nije bilo moguće sa sigurnošću dokazati flavonoidne aglikone, dok je u vrsti *M. thymifolia* dokazana prisutnost narančasto i svijetlozeleno fluorescirajućih zona koje su bojom i R_F -vrijednošću odgovarale kvercetin (R_F = 0,21) i kemferolu (R_F = 0,49).



Slika 13. Kromatogram flavonoidnih aglikona u odabranim vrstama roda *Micromeria*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC ploča

Pokretna faza: kloroform-etilacetat 6:4 (V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV 365 nm

Etanolni ekstrakti: Mc - *M. croatica*, Mj - *M. juliana*, Mt - *M. thymifolia*

Poredbeni flavonoidi: Kv/N - kvercetin/naringenin, L - luteolin, A - apigenin,
K - kemferol

4.1.2 Sadržaj fenolnih kiselina, flavonoida, trjeslovina i ukupnih polifenola u vrstama roda *Micromeria*

Udjeli bioaktivnih polifenolnih sastavnica u nadzemnim dijelovima vrsta roda *Micromeria* određeni su spektrofotometrijski prema postupcima detaljno opisanim u poglavljima od 3.3.4 do 3.3.6, a rezultati su prikazani u Tablici 6. Udjeli ukupnih polifenola u biljnim ekstraktima iznosili su visokih 9,69-13,06%, među kojima je bilo najviše fenolnih kiselina (5,26-6,84%). Trjeslovine su bile zastupljene s 3,07-6,08%, a udio flavonoida iznosio je 0,01-0,09%. Rezultati provedenih određivanja svrstali su ispitane vrste roda *Micromeria* u bogat izvor polifenola različite strukture. Endemična vrsta *M. croatica* posebice se isticala sadržajem fenolnih kiselina (6,84%), trjeslovina (6,08%) i ukupnih polifenola (13,06%), dok je najviše flavonoida sadržavala vrsta *M. thymifolia* (0,09%).

Tablica 6. Sadržaj fenolnih kiselina, flavonida, trjeslovina i ukupnih polifenola u etanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Micromeria*. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

Biljna vrsta	Sadržaj (%)			
	Fenolne kiseline	Flavonoidi	Trjeslovine	Ukupni polifenoli
<i>M. croatica</i>	6,84 \pm 0,06 ^a	0,01 \pm 0,0002 ^a	6,08 \pm 0,06 ^a	13,06 \pm 0,08 ^a
<i>M. juliana</i>	5,42 \pm 0,06 ^b	0,04 \pm 0,0003 ^b	5,14 \pm 0,20 ^b	10,75 \pm 0,58 ^b
<i>M. thymifolia</i>	5,26 \pm 0,01 ^c	0,09 \pm 0,02 ^c	3,07 \pm 0,35 ^c	9,69 \pm 0,58 ^c

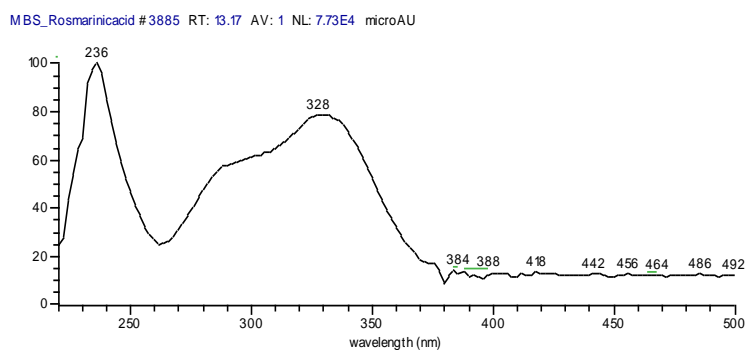
Vrijednosti s različitim slovom unutar stupca se međusobno značajno razlikuju ($p < 0,05$)

4.1.3 Sadržaj ružmarinske kiseline u liofiliziranim biljnim ekstraktima određen RP-HPLC-DAD metodom

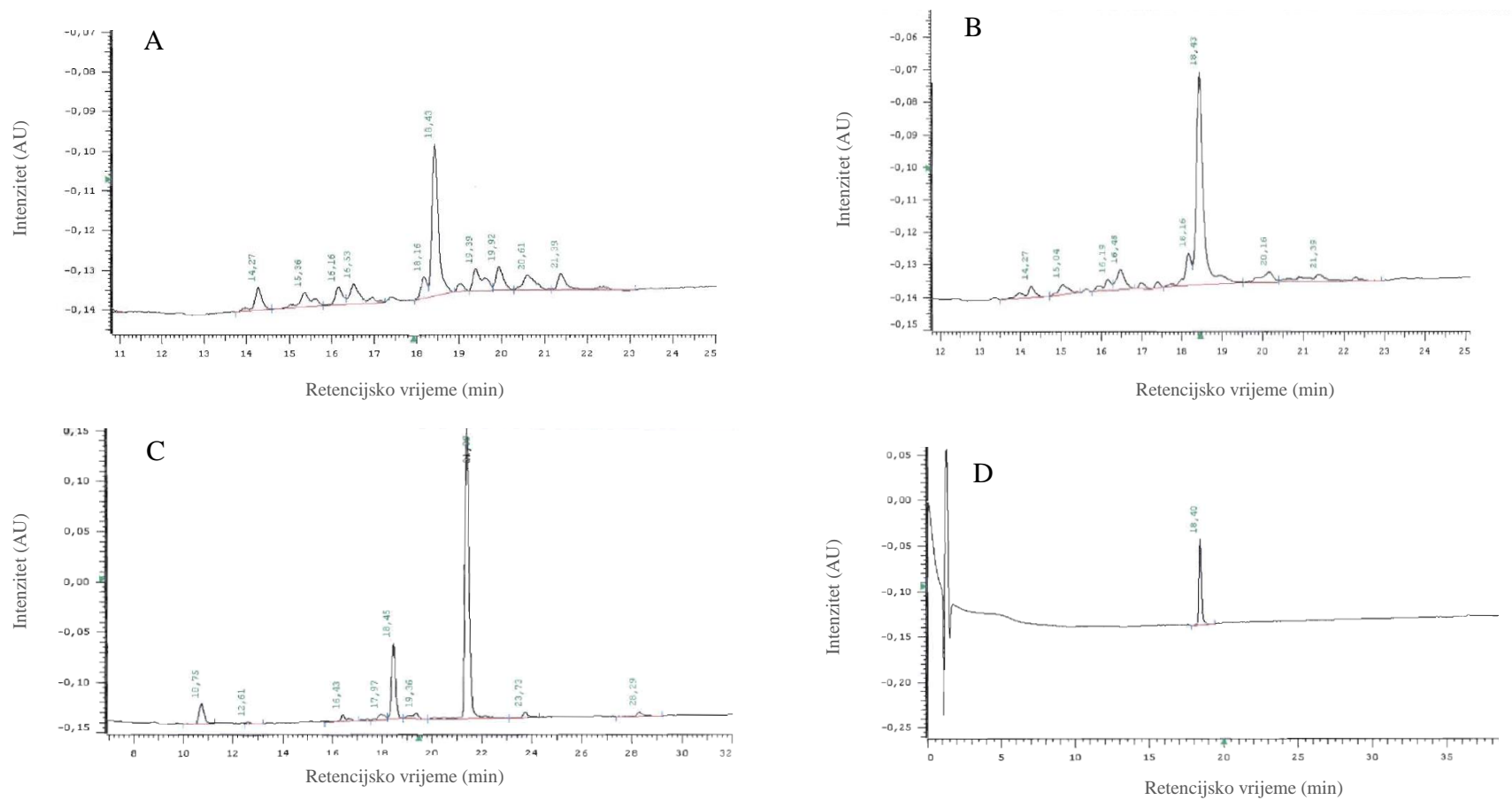
Pripremljene otopine liofiliziranih ekstrakata i referentne ružmarinske kiseline analizirane su primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (RP-HPLC-DAD). Ružmarinska kiselina u ekstraktima identificirana je prema UV/Vis spektru (Slika 14a) i retencijskom vremenu poredbene ružmarinske kiseline. Kvantifikacija je provedena ekstrapolacijom iz baždarnog dijagrama ovisnosti mase ružmarinske kiseline i površine ispod krivulje. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 7 i na Slici 14b. Liofilizirani etanolni ekstrakti vrsta *M. juliana* i *M. thymifolia* sadržavali su 26,01 mg/g i 25,65 mg/g ružmarinske kiseline, dok je njezin udio u ekstraktu vrste *M. croatica* bio gotovo dvostruko manji (13,50 mg/g). Prethodno je određeno da nadzemni dijelovi vrste *M. croatica* sadrže više ukupnih hidroksicimetnih derivata u odnosu na ostale dvije ispitane vrste (Poglavlje 4.1.2, Tablica 6), što ukazuje na činjenicu da je važna prisutnost i drugih fenolnih kiselina koje također doprinose biološkim učincima ove endemične vrste.

Tablica 7. Sadržaj ružmarinske kiseline u etanolnim ekstraktima vrsta roda *Micromeria* određen RP-HPLC-DAD metodom

Uzorak	t _R (min)	Površina pika	Sadržaj (mg/g)
<i>Micromeria croatica</i> (Pers.) Schott	18,43	202729	13,50
<i>Micromeria juliana</i> (L.) Bentham ex Reichenb.	18,43	390438	26,01
<i>Micromeria thymifolia</i> (Scop.) Fritsch	18,45	384681	25,63



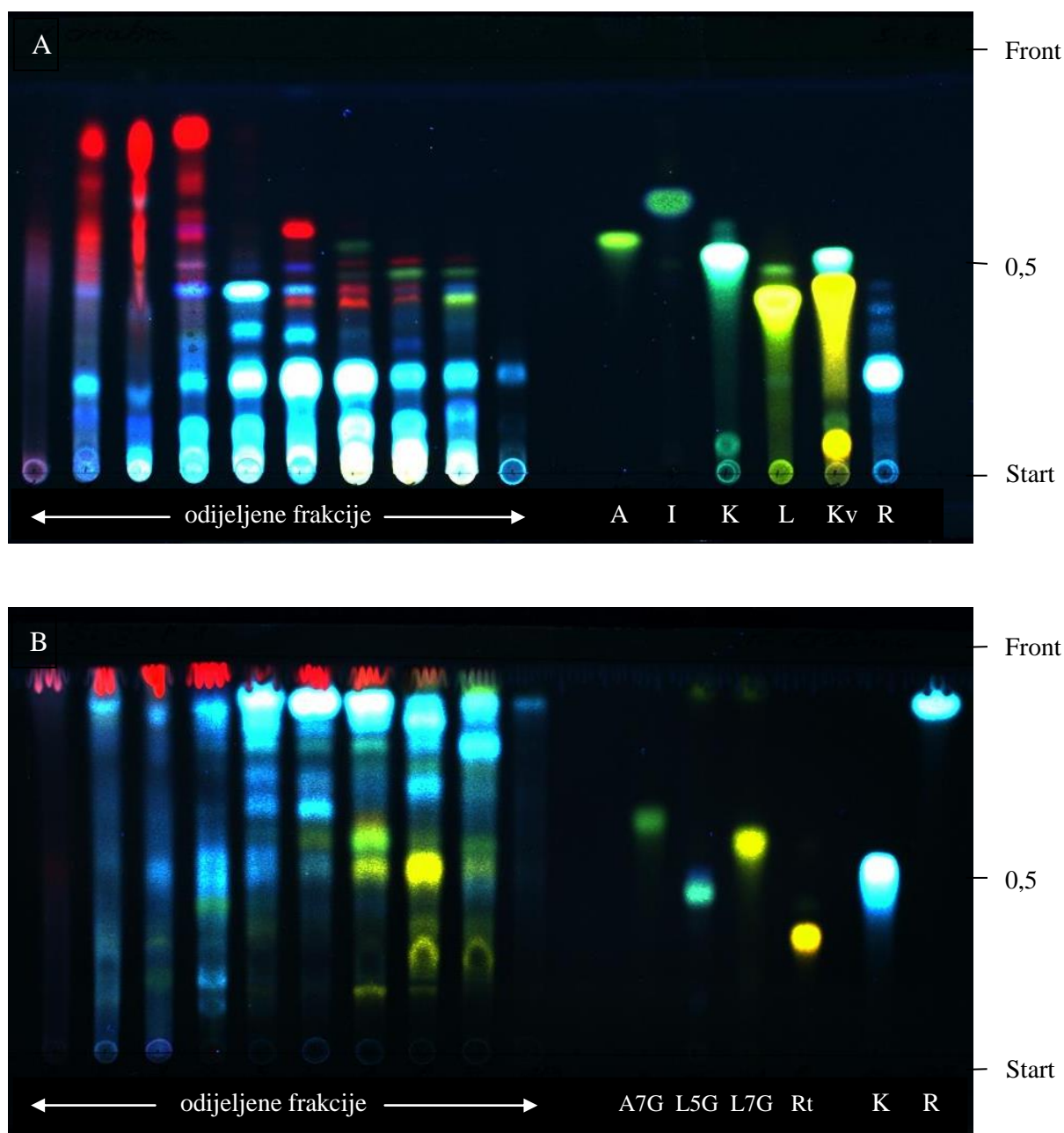
Slika 14a. UV-Vis spektar ružmarinske kiseline



Slika 14b. HPLC kromatogrami ružmarinske kiseline ($t_R = 18,43$ minuta) u etanolnim ekstraktima vrsta roda *Micromeria*
A - *Micromeria croatica*; B - *Micromeria juliana*; C - *Micromeria thymifolia*; D - Ružmarinska kiselina
Kolona: Zorbax SB-C18 (150 x 21 mm, 2,8 μ m); pokretna faza: 0,1%-tna mravlja kiselina u vodi (A), u metanolu (B), u acetonitrilu (C);
protok: 300 μ L/min; detekcija 280 nm

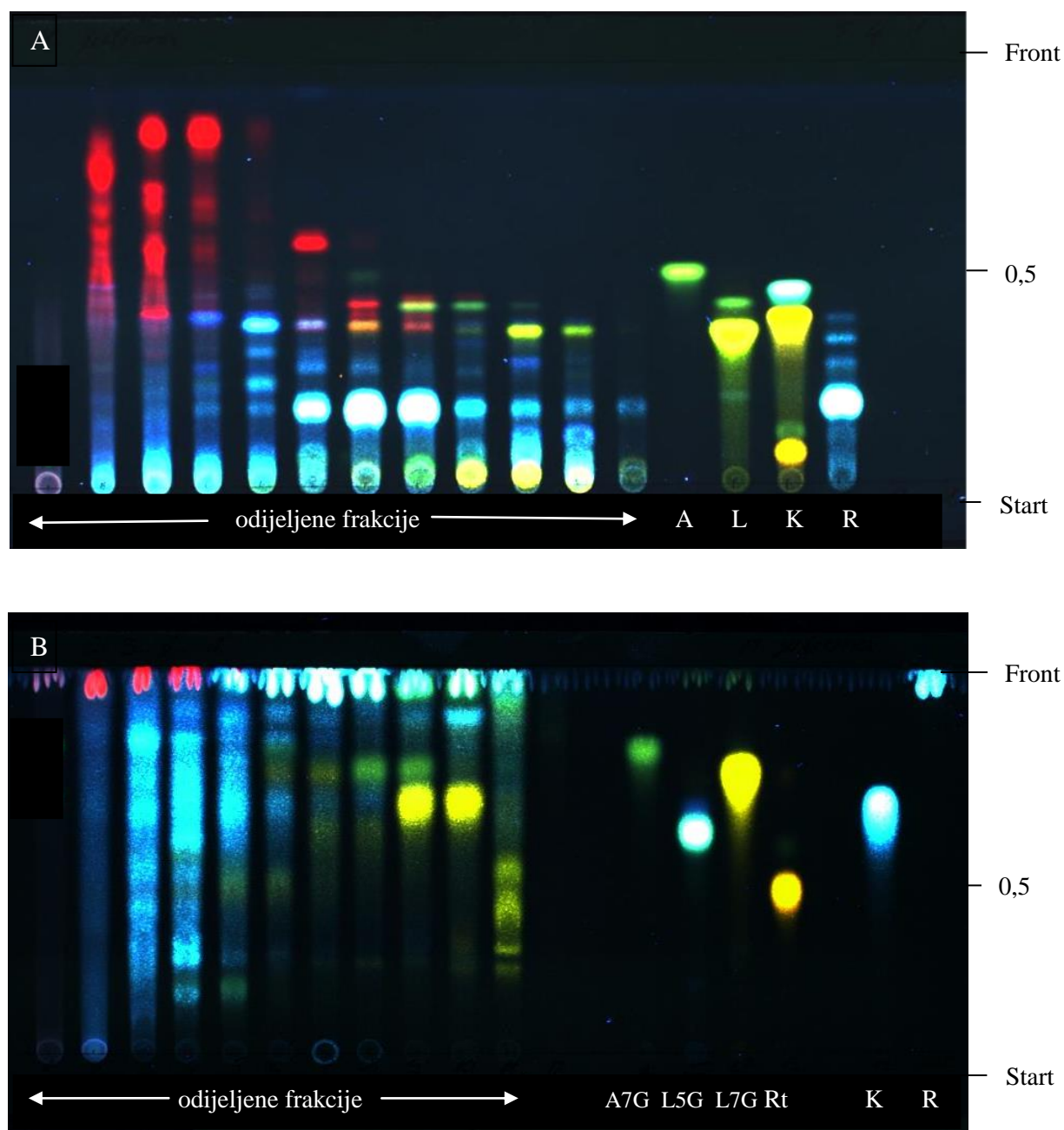
4.1.4 Izolacija flavonoida i fenolnih kiselina

Postupci pročišćavanja i frakcioniranja liofiliziranih ekstrakata biljnih vrsta *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* provedeni su gel-filtracijskom kromatografijom, vakuum ekstrakcijom na čvrstoj fazi i preparativnom kromatografijom na tankom sloju adsorbensa. Prvi korak frakcioniranja bio je propuštanje ekstrakta kroz stupac Sephadex LH-20 gela izbubrenog u metanolu u svrhu razdvajanja sastavnica po njihovoj veličini i uklanjanja frakcija sa sadržajem koji nije od interesa. Usporedno sa skupljanjem frakcija rađena je tankoslojna koromatografija te su na temelju dobivenih kromatograma združene frakcije sličnog sastava. Uparene frakcije ponovo su ispitane tankoslojnim kromatografijom usporedno s dvije pokretne faze: toluen, etilformijat i mravlja kiselina u volumnim omjerima 5:4:1 i etil acetat, etilmetilketon, mravlja kiselina i voda u volumnim omjerima 5:3:1:1. Temeljem rezultata analize, odabrane su frakcije od interesa za daljnja ispitivanja. Dobiveni kromatogrami za ispitivane biljne vrste prikazani su na Slikama 15-17. Odabrane frakcije ponovo su podvrgnute gel filtracijskoj kromatografiji na stupcu Sephadex LH-20 koji je prethodno izbubren u smjesi metanola i etil acetata u volumnim omjerima 9:1, a frakcije su također otopljene u istoj smjesi otapala. Odabrane podfrakcije dalje su obrađivane metodom vakuum ekstrakcije na čvrstoj fazi, uz prethodan odabir pogodnog eluensa za koji je ustanovljeno da najbolje razdvaja ispitivane sastavnice. Odijeljene sastavnice dodatno su pročišćene metodom preparativne kromatografije na tankom sloju adsorbensa (Slika 18), nakon čega su analizirane LC-ESI-MS/MS metodom.



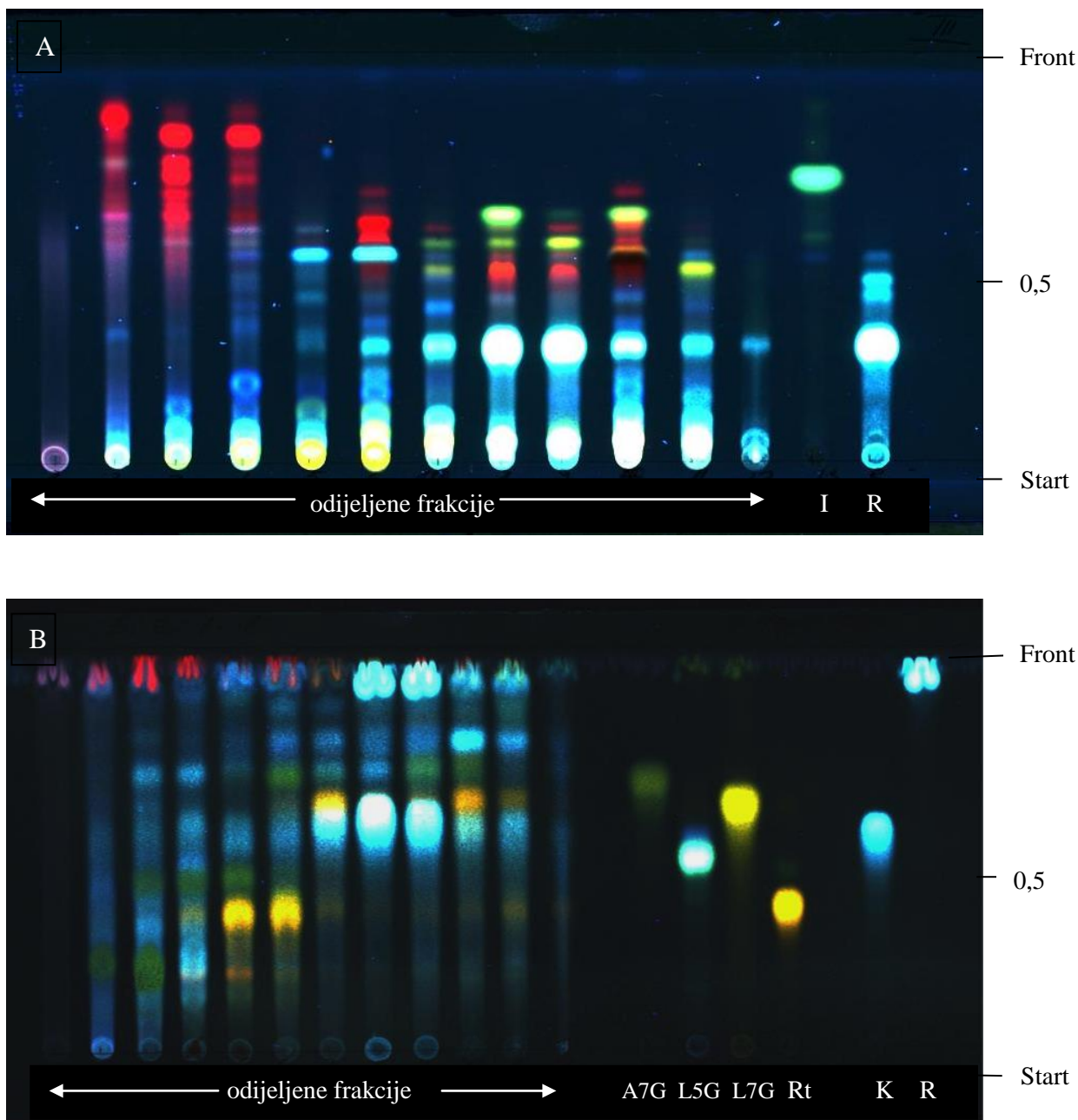
Slika 15. Kromatogrami fenolnih kiselina i flavonoida u odijeljenim frakcijama etanolnog ekstrakta vrste *Micromeria croatica*

- A. Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC ploča
 Pokretna faza: toluen-etilformijat-mravljja kiselina 5:4:1 (V/V/V)
 Detekcija: NST/PEG, UV 365 nm
 Poredbene supstancije: A - akacetin, I - izosakuranetin, K - kemferol, L - luteolin, Kv - kvercetin, R - ružmarinska kiselina
- B. Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC ploča
 Pokretna faza: etilacetat- etilmetilketon-mravljja kiselina-voda 5:3:1:1 (V/V/V/V)
 Detekcija: NST/PEG, UV 365 nm
 Poredbene supstancije: A7G - apigenin-7-glukozid, L5G - luteolin-5-glukozid, L7G - luteolin-7-glukozid, Rt - rutin, K - klorogenska kiselina, R - ružmarinska kiselina



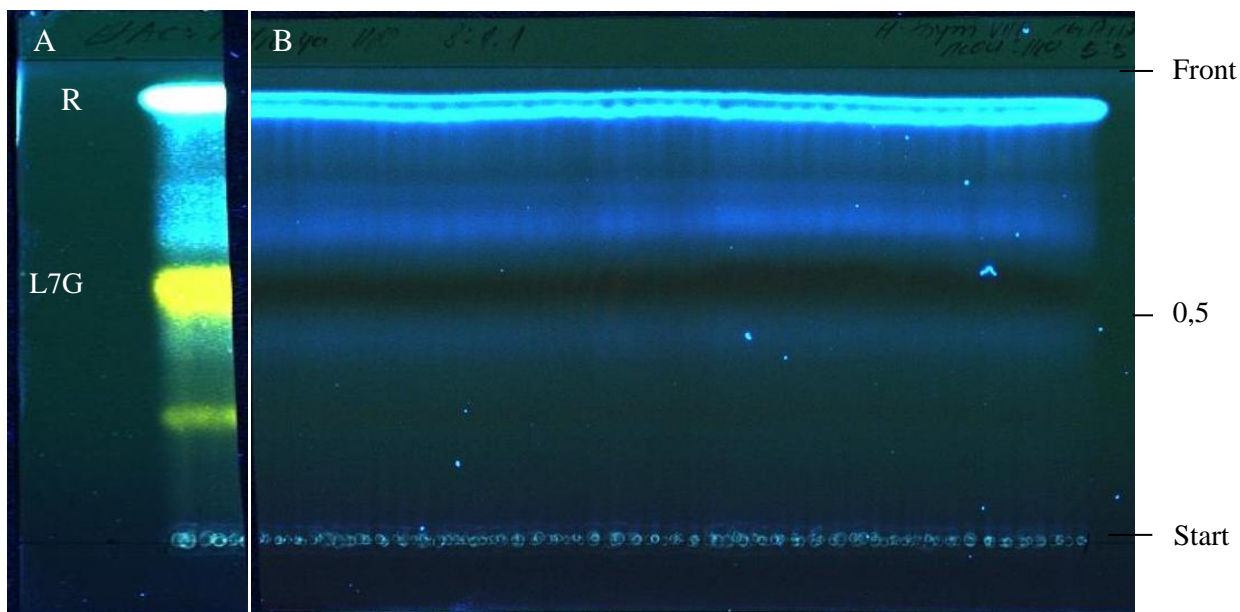
Slika 16. Kromatogrami fenolnih kiselina i flavonoida u odijeljenim frakcijama etanolnog ekstrakta biljne vrste *Micromeria juliana*

- A. Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC ploča
 Pokretna faza: toluen-etilformijat-mravljja kiselina 5:4:1 (V/V/V)
 Detekcija: NST/PEG, UV 365 nm
 Poredbene supstancije: A - akacetin, L - luteolin, K - kvercetin, R - ružmarinska kiselina
- B. Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC ploča
 Pokretna faza: etil acetat-etilmetilketon-mravljja kiselina-voda 5:3:1:1 (V/V/V/V)
 Detekcija: NST/PEG, UV 365 nm
 Poredbene supstancije: A7G - apigenin-7-glukozid, L5G - luteolin-5-glukozid, L7G - luteolin-7-glukozid, Rt - rutin, K - klorogenska kiselina, R - ružmarinska kiselina



Slika 17. Kromatogrami fenolnih kiselina i flavonoida u odijeljenim frakcijama etanolnog ekstrakta vrste *Micromeria thymifolia*

- A. Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC ploča
 Pokretna faza: toluen-etilformijat-mravljja kiselina 5:4:1 (V/V/V)
 Detekcija: NST/PEG, UV 365 nm
 Poredbene supstancije: I - izosakuranetin, R - ružmarinska kiselina
- B. Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC ploča
 Pokretna faza: etil acetat-etilmetilketon-mravljja kiselina-voda 5:3:1:1 (V/V/V/V)
 Detekcija: NST/PEG, UV 365 nm
 Poredbene supstancije: A7G - apigenin-7-glukozid, L5G - luteolin-5-glukozid, L7G - luteolin-7-glukozid, Rt - rutin, K - klorogenska kiselina, R - ružmarinska kiselina



Slika 18. Izolacija ružmarinske kiseline (R) i luteolin-7-glukuronida (L7G) iz odijeljene frakcije etanolnog ekstrakta vrste *Micromeria thymifolia* preparativnom kromatografijom na tankom sloju adsorbensa

A. Detekcija: UV 365 nm nakon prskanja reagensom NST/PEG

B. Detekcija: UV 254 nm

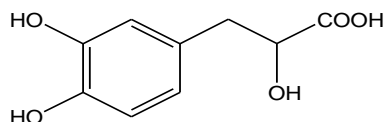
Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC ploča

Pokretna faza: toluen-etilformijat-mravljja kiselina 5:4:1 (V/V/V)

4.1.5 Identifikacija fenolnih kiselina i flavonoida u vezanom sustavu tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-ESI-MS/MS)

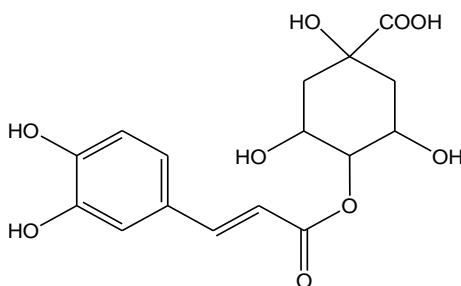
Identifikacija fenolnih kiselina i flavonoida u etanolnim ekstraktima vrsta roda *Micromeria* provedena je u vezanom sustavu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije, uz metodu ionizacije elektroraspršenjem. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 8a-8c i 9. U ispitivnim biljnim vrstama identificirane su sljedeće fenolne kiseline: ružmarinska, kavena, klorogenska, neoklorogenska (3-kavenoilkina kiselina) i kriptoklorogenska (4-kavenoilkina kiselina), salvianolna J i B, te dimeri i trimeri ružmarinske kiseline. Ustanovljeno je također da biljni ekstrakti sadrže flavonoidne glikozide akacetina, apigenina, diosmetina, kemferola, kvercetina i luteolina te akacetin i diosmetinu slobodnom obliku.

U sva tri ispitana ekstrakta vrsta roda *Micromeria* identificirana je **3-(3,4-dihidroksifenil)mlječna kiselina** ($UV_{\max} = 282 \text{ nm}$). Na spektru (Slika 26) je uočen deprotonirani molekulski ion $[M-H]^-$ pri m/z 197 koji odgovara njenoj molekulskoj masi (198). Drugom fragmentacijom dobiven je MS^2 spektar sa signalima pri m/z 179, 153, 135 i 73 koji se slažu s podacima u literaturi (Zang i sur., 2008). Slika 19 prikazuje strukturu 3-(3,4-dihidroksifenil)mlječne kiseline.



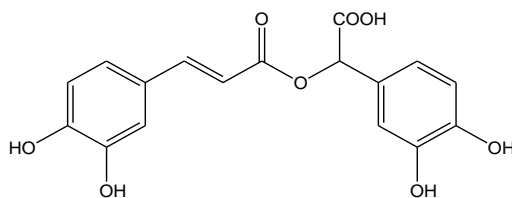
Slika 19. 3-(3,4-dihidroksifenil)mlječna kiselina

4-Kavenoilkina kiselina (kriptoklorogenska, slika 20) pripada skupini izomera klorogenske (5-kavenoilkina) kiseline i potvrđena je u sva tri ispitana ekstrakta ($UV_{\max} = 245, 327 \text{ nm}$). Na spektru je bilo moguće uočiti glavni molekulski ion $[M-H]^-$ pri m/z 353 koji odgovara molekulskoj masi klorogenske kiseline (354). Drugom fragmentacijom dobiveni su signali na m/z 191, m/z 179 (odgovara kavenoj kiselini), m/z 173 te m/z 135 koji predstavlja fragment kavene kiseline nakon gubitka karboksilne skupine (-44). Idućnu fragmentaciju kriptoklorogenske kiseline prethodno su opisali Wang i suradnici (2009).



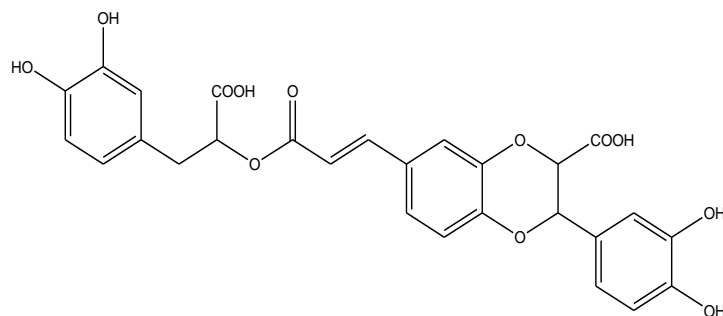
Slika 20. 4-kavenoilkina kiselina

Ustanovljeno je da sva tri ispitana biljna ekstrakta sadrže **ružmarinsku kiselinu** ($UV_{\max} = 330 \text{ nm}$) čija je struktura prikazana na slici 21. Detektiran je glavni molekulski ion $[M-H]^-$ pri m/z 359 koji odgovara molekulskoj masi ružmarinske kiseline (360). Druga fragmentacija dala je MS^2 spektar sa signalima koji ukazuju na strukturne dijelove ružmarinske kiseline: signal m/z 179 odgovara kavenoj kiselini, m/z 197 2-hidroksi derivatu hidroksikavene kiseline, m/z 161 fragmentu koji nastaje nakon što 2-hidroksi derivat hidroksikavene kiseline izgubi molekulu vode (-18), dok m/z 135 odgovara fragmentu kavene kiseline nakon gubitka karboksilne skupine (-44). Dobiveni rezultati potvrđeni su usporedbom s referentnom supstancijom i literaturnim podacima (Hossian i sur., 2010).



Slika 21. Ružmarinska kiselina

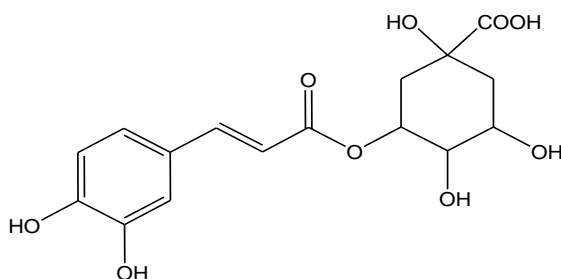
U ekstraktima ispitanih vrsta identificirana je **salvianolna kiselina J** (Slika 22) koja sadrži tri fenilne skupine i predstavlja trimer fenolne kiseline ($UV_{\max} = 278 \text{ nm}$). Deprotonirani ion $[M-H]^-$ pri m/z 537 u spektru odgovarao je molekulskoj masi salvianolne kiseline J. Drugom fragmentacijom nastao je MS^2 spektar sa signalom pri m/z 493 koji odgovara gubitku karboksilne skupine (-44) te m/z 295 (Liu i sur., 2007).



Slika 22. Salvianolna kiselina J

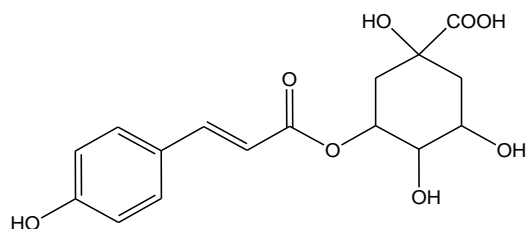
Osim ružmarinske kiseline, u vrsti *M. croatica* ustanovljena je prisutnost **dimera** ($t_R = 28,79$ min; $UV_{max} = 332$ nm) i **trimera ružmarinske kiseline** ($t_R = 30,53$ min; $UV_{max} = 334$ nm), dok je vrsta *M. juliana* sadržavala samo trimer ružmarinske kiseline. Dimer ružmarinske kiseline identificiran je prema deprotoniranom molekulskom ionu $[M-H]^-$ pri m/z 717 koji ukazuje na molekulsku masu od dvije molekule ružmarinske kiseline. Drugom fragmentacijom spektar je pokazao signal m/z 519 nastao gubitkom 2-hidroksi derivata hidroksikavene kiseline (197) i m/z 357 koji moguće nastaje odcjepljivanjem p-kumarinske kiseline (164) iz fragmenta zabilježenog na m/z 519. Trimer je identificiran prema deprotoniranom molekulskom ionu $[M-H]^-$ pri m/z 1075 koji odgovara molekulskoj masi tri molekule ružmarinske kiseline. Identično fragmentaciji dimerne strukture, u MS^2 spektru zabilježeni su signali na m/z 519 i m/z 357.

Među ispitanim uzorcima, samo je u ekstraktu vrste *M. thymifolia* identificirana **3-kavenoilkina kiselina** (neoklorogenska, Slika 23) s retencijskim vremenom 4,41 min i apsorpcijskim maksimumom na 245 nm i 326 nm. U prvom spektru masa pri m/z 353 uočen je glavni ion $[M-H]^-$ koji odgovara molekulskoj masi klorogenske kiseline (354). U drugoj fragmentaciji zabilježen je signal m/z 191 koji odgovara kina kiselini (192), a gubitkom molekule vode prelazi u fragment detektiran pri m/z 173. Signal m/z 179 odgovara kavenoj kiselini (180) koja gubitkom karboksilne skupine prelazi u fragment zabilježen pri m/z 135 (Villarino i sur., 2011). Iako je opisana fragmentacija identična fragmentaciji 4-kavenoil kina kiseline, razlika u vremenu zadržavanja u LC koloni govori u prilog da se radi o dva različita izomera klorogenske kiseline (Tablica 8c).

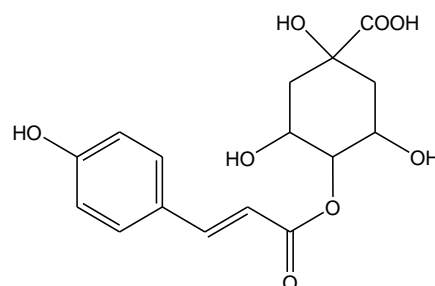


Slika 23. 3-kavenoilkina kiselina

U vrsti *M. thymifolia* identificirane su **3-*p*-kumaroilkina** ($t_R = 7,27$ min) i **4-*p*-kumaroilkina** ($t_R = 9,81$ min) s istim apsorpcijskim maksimuma na 312 nm i 314 nm. Struktura ovih kiselina prikazana je na slici 24 a i b. Obje su kiseline u prvoj fragmentaciji dale signal m/z 337, a razlikovale su se prema drugoj fragmentaciji, pri čemu 3-*p*-kumaroilkina kiselina daje signal m/z 163 koji odgovara *p*-kumarinskoj kiselini (164) te m/z 119 koji odgovara fragmentu *p*-kumarinske kiseline nakon gubitka karboksilne skupine. Zabilježeni signal m/z 173 potječe od 4-*p*-kumaroilkina kiseline. Navednu fargmentaciju pronalazimo i u radu kojeg su objavili Dou i suradnici (2007).



Slika 24a. 3-*p*-kumaroilkina kiselina



Slika 24b. 4-*p*-kumaroilkina kiselina

Spektrofotometrijskim metodama provedenim u ovom radu određen je visoki udio fenolnih kiselina (5,26-6,84%), dok su flavonoidi bili znatno manje zastupljeni u sve tri ispitane vrste roda *Micromeria* (0,01-0,09%). Iz Tablice 6 i Slike 12 vidljivo je da vrsta *M. thymifolia* sadrži značajno više flavonoida u odnosu na druge dvije. Iako su flavonoidi prisutni u relativno malom postotku, njihov se doprinos biološkim učincima ispitanih vrsta ne bi trebao zanemariti. Iz tog razloga LC-ESI-MS/MS analizom obuhvaćeni su i flavonoidi. U vrsti *M. thymifolia* bili su prisutni derivati kvercetina i kemferola (flavonoli), diosmetina, akacetina i apigenina (flavoni) te hesperetina (flavanon), dok su vrste *M. croatica* i *M. juliana* uglavnom sadržavale luteolinske derivate (flavoni).

Luteolin-O-diglukuronid i luteolin-O-triglukuronid identificirani su u obje vrste, luteolin-O-glukuronid u vrsti *M. juliana*, a apigenin-7-O-glukuronid u vrsti *M. croatica*.

U spektru **luteolin-O-triglukuronida** ($UV_{\max} = 269, 343 \text{ nm}$) uočen je deprotonirani ion $[M-H]^-$ pri m/z 813 koji odgovara njegovoj molekulskoj masi. Drugom fragmentacijom nastal su signali pri m/z 637 (odgovara gubitku prve glukuronske kiseline; -176), m/z 461 (gubitak druge glukuronske kiseline) i m/z 285 (gubitak treće glukuronske kiseline) koji odgovara aglikonu luteolinu (286).

UV-Vis spektar **luteolin-O-diglukuronida** imao je apsorpcijske maksimume na 268(9) nm i 348(9) nm. Molekulskoj masi diglukuronida (638) odgovarao je deprotonirani ion $[M-H]^-$ kod m/z 637, a fragmentacijski ioni m/z 461 i m/z 285 ukazali su na gubitak najprije jedne a zatim i druge glukuronske kiseline. Posljednji signal odgovarao je molekulskoj masi luteolina (286).

Luteolin-O-glukuronid ($t_R = 18,66 \text{ min}$) imao je apsorpcijski maksimum na 268 nm i 348 nm. Deprotonirani molekularni ion $[M-H]^-$ pri m/z 461 odgovarao je njegovoj molekulskoj masi (462), a u drugom fragmentaciji nastao je signal m/z 285 koji odgovara luteolinu (Sánchez-Rabaneda i sur., 2003).

Rutin, izokvercitrin, kemferol-3-O-rutinozid, kemferol-3-O-galaktozid(glukozid), diosmin, akacetin-O-acetilglukozil-ramnozid glukozid i akacetin potvrđeni su u etanolnom ekstraktu vrste *M. thymifolia*.

U spektru **rutina** ($t_R = 16,81 \text{ min}$; $UV_{\max} = 257, 354 \text{ nm}$) isticao se deprotonirani molekularni ion $[M-H]^-$ pri m/z 609 koji odgovara molekulskoj masi ovog glikozida, a drugom fragmentacijom dobiven je signal m/z 301 koji odgovara aglikonu kvercetinenu nakon gubitka disaharida rutinoze. Daljnja fragmentacija kvercetinena dala je signale m/z 283 (odgovara gubitku molekule vode; -18), m/z 255 (odgovara gubitku karbonilne skupine; -28) i m/z 151 (odgovara fragmentu s fenolnim A prstenom kvercetinena) (Tsimogiannis i sur., 2007).

Izokvercitrin ($t_R = 18,12 \text{ min}$; $UV_{\max} = 257, 354 \text{ nm}$) je identificiran prema glavnom molekularnom ionu $[M-H]^-$ pri m/z 463 te fragmentacijskom ionu m/z 301 u MS2 spektru koji odgovara aglikonu kvercetinenu.

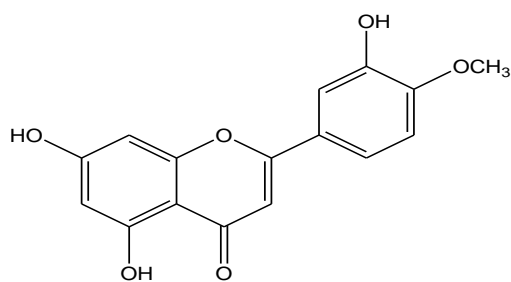
U spektru **kemferol-3-O-rutinozida** ($t_R = 24,15 \text{ min}$; $UV_{\max} = 267, 346 \text{ nm}$) isticao se glavni molekularni ion $[M-H]^-$ pri m/z 593. Druga fragmentacija dala je signal m/z 285 koji odgovara gubitku rutinoze. Daljnjom fragmentacijom aglikona kemferola nastali su signali m/z 267 i m/z 257 zbog gubitka vode te karbonilne skupine, dok su signali m/z 163 i m/z 151 nastali fragmentacijom prstena A (Tsimogiannis i sur., 2007; Sánchez-Rabaneda i sur., 2003).

Retencijsko vrijeme za **kemferol-3-O-glukozid(galaktozid)** iznosilo je 24,86 min, a UV-Vis spektar imao je apsorpcijske maksimume na 268 nm i 340 nm. Deprotonirani molekulski ion $[M-H]^-$ pri m/z 447 odgovarao je molekulskoj masi ovog glikozida (448). Fragmentacijom, odnosno gubitkom šećera, pojavio se signal m/z 285 koji odgovara kemferolu. Navedeni gubitak od 163 ukazao je na odcjepljenje molekule glukoze ili galaktoze. Daljnom fragmentacijom nastali su signali m/z 257 (gubitak karbonilne skupine) te m/z 163 i m/z 151 (fragmentacija prstena A u strukturi kemferola). Slične fragmentacije opisane su i u literaturi (Tsimogiannis i sur., 2007; Sánchez-Rabaneda i sur., 2003).

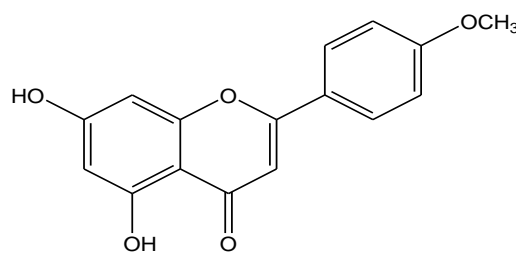
Diosmin ($t_R = 26,57$ min; $UV_{max} = 254$ nm, 269 nm, 346 nm) je identificiran prema glavnom molekulskom ionu $[M-H]^-$ pri m/z 607 koji odgovara molekulskoj masi ovog glikozida (608). U drugoj fragmentaciji zabilježen je gubitak rutinoze (-308), a nastali signal m/z 299 odgovarao je diosmetinu (300) čija struktura je prikazana na slici 25a. Daljnom fragmentacijom aglikona diosmetina dobiven je signal m/z 284 koji nastaje gubitkom metilne skupine. Opisana fragmentacija potvrđena je usporedbom s referentnom supstancijom i literaturnim podacima (Campanero i sur., 2010, Brito i sur., 2014).

Retencijsko vrijeme za **akacetin-O-acetilglukozil-ramnozil-glukozid** iznosilo je 30,59 min, a UV-Vis spektar imao je apsorpcijske maksimume na 270 nm i 335 nm. Deprotonirani ion $[M-H]^-$ pri m/z 795 odgovarao je molekulskoj masi ovog glikozida (796). Daljnja fragmentacija dala je signale m/z 753 i m/z 735 koje možemo povezati s gubitkom acetila. Signal pri m/z 283 odgovarao je akacetinu, a nastao je zbog gubitka fragmenta kompleksnog šećernog dijela, dok je signal m/z 268 odgovarao gubitku vode (Marin i sur., 2001).

Slobodni aglikon **akacetin** ($t_R = 40,00$ min; $UV_{max} = 270$, 333 nm) identificiran je prema glavnom molekulskom ionu $[M-H]^-$ pri m/z 283 koji je odgovarao njegovoj molekulskoj masi, a daljnjim gubitkom vode nastao je signal m/z 268 (Hossain i sur., 2010). Struktura akacetina prikazana je na slici 25b.



Slika 25a. Diosmetin



Slika 25b. Akacetin

Tablica 8a. Sastav fenolnih kiselina i flavonoida u etanolnom ekstraktu vrste *Micromeria croatica* određen LC-ESI-MS/MS metodom

Sastavnica	Mr	t _R (min)	UV _{max} (nm)	[M-H] ⁻ / (m/z)
3-(3,4-Dihidroksifenil) mliječna kiselina	198	2,73	282	197 [M-H] ⁻ / 179, 153, 135, 73
4-Kavenoilkina kiselina (kriptoklorogenska)	354	8,63	327	353 [M-H] ⁻ / 191, 179, 173, 135
Luteolin-O-triglukuronid	814	11,36	269, 343	813 [M-H] ⁻ / 637, 527, 461, 351, 285
Luteolin-O-diglukuronid	638	11,73	269, 348	637 [M-H] ⁻ / 461, 351, 285, 175
Salvianolna kiselina J	538	12,72	278	537 [M-H] ⁻ / 493, 295
Ružmarinska kiselina	360	26,01	330	359 [M-H] ⁻ / 197, 179, 161, 133
Dimer ružmarinske kiseline	718	28,79	332	717 [M-H] ⁻ / 519, 357
Trimer ružmarinske kiseline	1076	30,53	334	1075[M-H] ⁻ / 519, 357

Tablica 8b. Sastav fenolnih kiselina i flavonoida u etanolnom ekstraktu vrste *Micromeria juliana* određen LC-ESI-MS/MS metodom

Sastavnica	Mr	t _R (min)	UV _{max} (nm)	[M-H] ⁻ / (m/z)
3-(3,4-Dihidroksifenil)mlječna kiselina	198	2,78	282	197 [M-H] ⁻ / 179, 153, 135, 73
4-Kavenoilkina kiselina (kriptoklorogenska)	354	8,63	327	353 [M-H] ⁻ / 191, 179, 173, 135
Luteolin-O-triglukuronid	814	11,41	269, 343	813 [M-H] ⁻ / 637, 527, 461, 351, 285
Luteolin-O-diglukuronid	638	11,79	268, 349	637 [M-H] ⁻ / 461, 351, 285, 175
Salvianolna kiselina J	538	12,77	277	537 [M-H] ⁻ / 493, 295
Luteolin-O-glukuronid	462	18,66	268, 348	461 [M-H] ⁻ / 285, 175
Ružmarinska kiselina	360	26,04	330	395 [M-H] ⁻ / 197, 179, 161, 133
Trimer ružmarinske kiseline	1076	30,53	334	1075 [M-H] ⁻ / 896, 519, 357

Tablica 8c. Sastav fenolnih kiselina i flavonoida u etanolnom ekstraktu vrste *Micromeria thymifolia* određen LC-ESI-MS/MS metodom

Sastavnica	Mr	t _R (min)	UV _{max} (nm)	[M-H] ⁻ / (m/z)
3-(3,4-Dihidroksifenil) mliječna kiselina	198	2,76	283	197 [M-H] ⁻ / 179, 153, 135, 73
3-Kavenoilkina kiselina (neoklorogenska)	354	4,41	245, 326	353 [M-H] ⁻ / 191, 179, 173
3- <i>p</i> -Kumaroilkina kiselina	338	7,27	312	337 [M-H] ⁻ / 163, 119
4-Kavenoilkina kiselina (kriptoklorogenska)	354	8,65	327	353 [M-H] ⁻ / 191, 179, 173, 135
4- <i>p</i> -Kumaroilkina kiselina	338	9,81	314	337 [M-H] ⁻ / 173, 163, 155
Salvianolna kiselina J	538	12,58	278	537 [M-H] ⁻ / 493, 295
Rutin (kvercetin-3-O-rutinozid)	610	16,81	257, 354	609 [M-H] ⁻ / 301, 283, 255, 179, 151
Izokvercitrin (kvercetin-3-O-glukozid)	464	18,14	257, 354	463 [M-H] ⁻ / 301, 179, 151
Kemferol-3-O-rutinozid	594	24,15	267, 346	593 [M-H] ⁻ / 285, 267, 257, 163, 151, 135
Kemferol-3-O-galaktozid/glukozid	448	24,86	268, 340	447 [M-H] ⁻ / 285, 257, 163, 151, 135
Ružmarinska kiselina	360	26,03	330	359 [M-H] ⁻ / 197, 179, 161, 133
Diosmin (diosmetin-O-rutinozid)	608	26,57	254, 269, 346	607 [M-H] ⁻ / 299, 284
Akacetin-O-acetilglukozil-ramnozil glukozid	796	30,59	270, 335	795 [M-H] ⁻ / 753, 735, 283, 268
Akacetin	284	40,00	270, 333	283 [M-H] ⁻ / 268

Uz prethodno identificirane fenolne kiseline i flavonoide, ustanovljeno je da ispitivani biljni ekstrakti sadrže i druge strukturno slične sastavnice koje se nisu mogle dobro razlučiti u prethodnim uvjetima analize. Stoga su etanolni ekstrakti ispitivanih vrsta roda *Micromeria* podvrgnuti frakcioniranju i pročišćavanju. Odabrane frakcije analizirane su LC-ESI-MS/MS metodom, uz primijenjene nove uvjete analize navedene u poglavlju 3.3.9 B. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 9.

Kavena kiselina ($t_R = 4,82$ min; $UV_{max} = 238, 324$ nm) identificirana je u vrsti *M. croatica*. Na dobivenom spektru zabilježen je deprotonirani ion $[M-H]^-$ pri m/z 179 koji odgovara molekulskoj masi kavene kiseline (180). Daljnom fragmentacijom, odnosno gubitkom karboksilne skupine, nastao je signal pri m/z 135 (Zang i sur., 2008; Chen i sur., 2012).

U odijeljenoj frakciji ekstrakta vrste *M. thymifolia* identificirana je **salvianolna kiselina B** s retencijskim vremenom 13,88 min i apsorpcijskim maksimumima na 240 nm, 288 nm i 326 nm. Deprotonirani ion $[M-H]^-$ nastao pri m/z 717 odgovarao je molekulskoj masi kiseline (718), a drugom fragmentacijom dobiveni su signali m/z 519, m/z 357 i m/z 339 (Liu i sur., 2007).

Apigenin-O-glukuronid ($t_R = 15,05$ min; $UV_{max} = 266, 336$ nm) identificiran je u vrsti *M. croatica*. Deprotonirani molekularni ion $[M-H]^-$ pri m/z 445 odgovarao je molekulskoj masi flavonoidnog glikozida (446), a gubitkom glukuronske kiseline (-176) nastao je signal pri m/z 269 (odgovara apigeninu; 270) (Qu i sur., 2001).

Ustanovljeno je da vrsta *M. thymifolia* sadrži **apigenin-O-rutinozid** ($t_R = 11,78$ min; $UV_{max} = 266, 336$ nm). Spektrometrijom masa ovaj glikozid dao je deprotonirani molekularni ion $[M-H]^-$ pri m/z 577, a njegovom fragmentacijom, odnosno gubitkom disaharida rutinoze (-308), nastao je signal m/z 269 koji odgovara aglikona apigeninu (Sánchez-Rabaneda i sur., 2003).

U frakciji ekstrakta vrste *M. juliana* identificiran je **diosmin** ($t_R = 12,69$ min; $UV_{max} = 250, 266, 344$ nm). U spektru se isticao deprotonirani ion $[M-H]^-$ pri m/z 607 koji odgovara molekulskoj masi diosmina (608). Drugom fragmentacijom došlo je do gubitka rutinoze (-308) i nastanka signala m/z 299 (aglikon diosmetin; 300). Daljnom fragmentacijom diosmetina nastao je signal m/z 284 koji odgovara gubitku metilne skupine. Dobiveni rezultati potvrđeni su usporedbom s referentnom supstancijom i literaturnim podacima (Campanero i sur., 2010; Brito i sur., 2014).

Slobodni aglikon **diosmetin** ($t_R = 19,94$ min; $UV_{max} = 250, 266, 344$ nm) također je identificiran u vrsti *M. thymifolia*. Deprotonirani ion pri m/z 299 odgovarao je diosmetinu

(300). Fragmentacijom je nastao signal m/z 284 koji odgovara gubitku metilne skupine (Slika 27). Dobiveni rezultati potvrđeni su usporedbom s referentnom supstancijom i literaturnim podacima (Campanero i sur., 2010, Brito i sur., 2014).

Luteolin-5/7-metileter potvrđen je u frakciji ekstrakta *M. thymifolia* ($t_R = 23,83$ min; $UV_{max} = 264, 352$ nm). Deprotonirani ion $[M-H]^-$ pri m/z 299 odgovarao je molekulskoj masi ovog aglikona (300), a daljnjom fragmentacijom došlo je do gubitka metilne skupine (-15) i nastanka signala m/z 284 koji odgovara luteolinu (Gardana i sur., 2007).

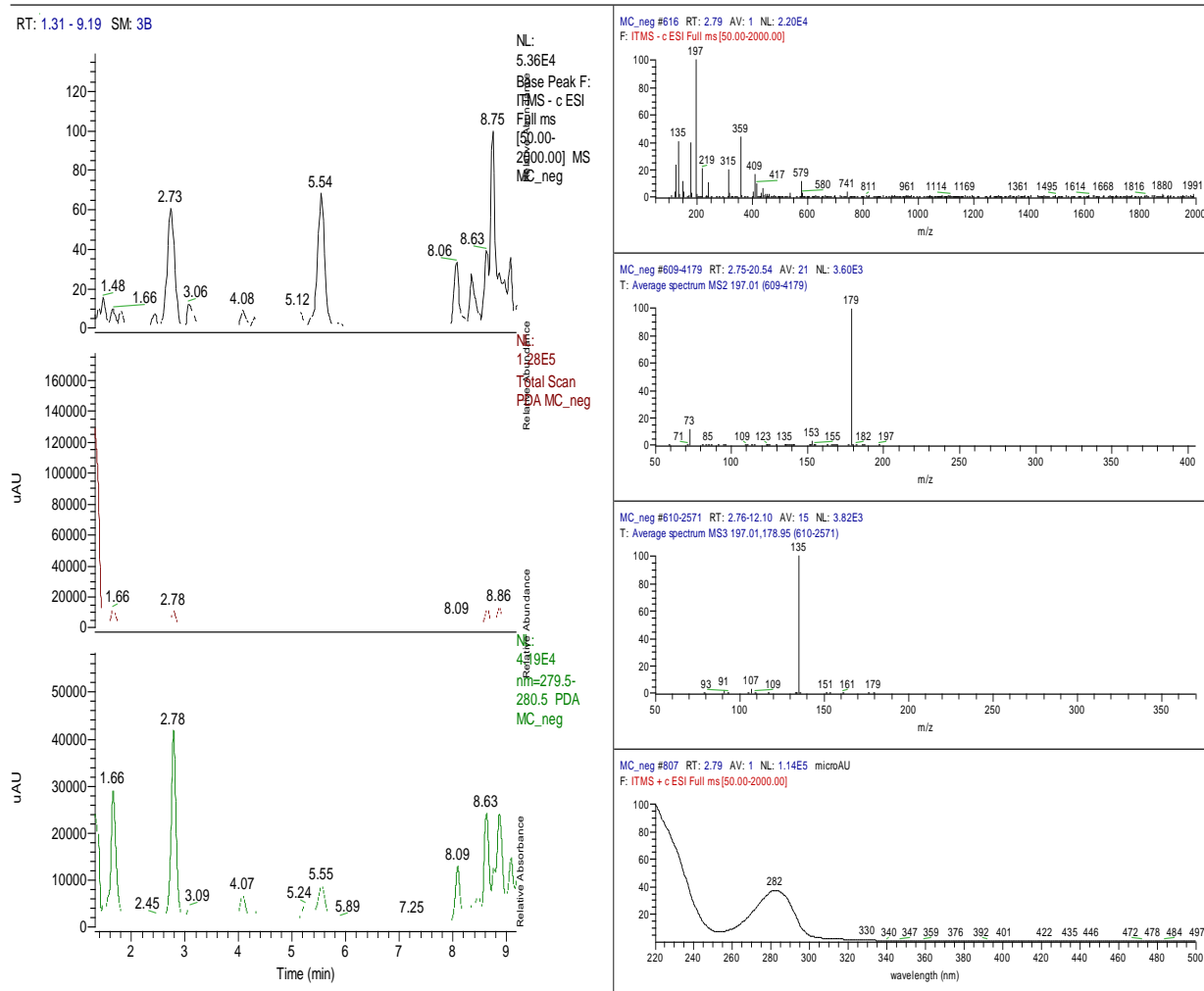
U jednoj od odijeljenih frakcija ekstrakta *M. thymifolia* potvrđen je **hesperidin** ($t_R = 14,27$ min; $UV_{max} = 234, 284$ nm). U spektru ovog flavanonskog glikozida isticao se glavni molekulski ion $[M-H]^-$ pri m/z 610 (odgovara molekulskoj masi hesperidina; 611). Gubitkom rutinoze (-308) nastao je fragmentacijski ion aglikona hesperetina sa signalom m/z 301 (Li i sur., 2004; Tong i sur., 2012).

Tablica 9. Sastav fenolnih kiselina i flavonoida u odijeljenim frakcijama etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* određen LC-ESI-MS metodom

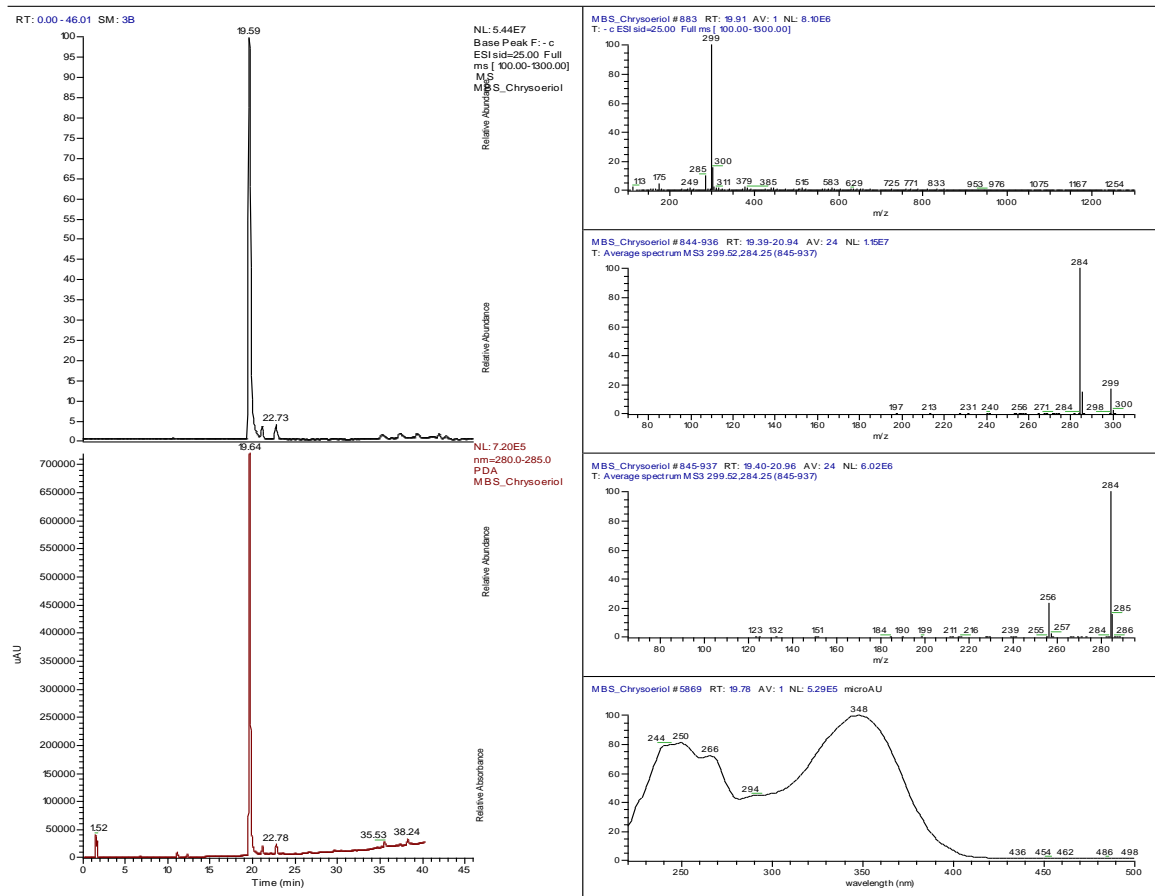
Sastavnica	Mr	t _R (min)	UV _{max} (nm)	[M-H] ⁻ m/z	Biljna vrsta
Kavena kiselina	180	4,82	238, 324	179 [M-H] ⁻ / 135	<i>M. croatica</i>
Apigenin-O-glukuronid	446	15,05	266, 336	445 [M-H] ⁻ / 269,175	<i>M. croatica</i>
Ružmarinska kiselina	360	15,47	238, 330	359 [M-H] ⁻ / 197, 179, 161	<i>M. croatica</i>
Diosmin	608	12,69	250, 266, 344	607 [M-H] ⁻ / 299, 284	<i>M. juliana</i>
3-Kavenoilkina kiselina (neoklorogenska)	354	10,16	242, 326	353 [M-H] ⁻ / 191, 179, 173	<i>M. thymifolia</i>
Izokvercitrin	464	10,59	254, 352	463 [M-H] ⁻ / 301, 271, 255, 179, 151	<i>M. thymifolia</i>
Apigenin-O-glukozid/rutinozid	579	11,78	266, 336	577 [M-H] ⁻ / 269	<i>M. thymifolia</i>
Kemferol-3-O-rutinozid	595	11,78	264, 348	594 [M-H] ⁻ / 285,151,135	<i>M. thymifolia</i>
4-Kavenoilkina kiselina (kriptoklorogenska)	354	12,59	242, 326	353 [M-H] ⁻ / 191, 179, 173	<i>M. thymifolia</i>
Ružmarinska kiselina	360	13	238, 330	359 [M-H] ⁻ / 197, 179, 161	<i>M. thymifolia</i>
Salvianolna kiselina B	719	13,88	240, 288, 326	717 [M-H] ⁻ / 519, 339, 357	<i>M. thymifolia</i>
Hesperidin (hesperetin-7-O-rutinozid)	611	14,27	234, 284	610 [M-H] ⁻ / 343, 325, 343	<i>M. thymifolia</i>

Tablica 9. Sastav fenolnih kiselina i flavonoida u odijeljenim frakcijama etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* određen LC-ESI-MS metodom - nastavak

Sastavnica	Mr	t _R (min)	UV _{max} (nm)	[M-H] ⁻ m/z	Biljna vrsta
Akacetin-7-O-acetilglukozil-ramnozil glukozid	796	15,02	266, 332	795 [M-H] ⁻ / 753, 735, 693, 283,268	<i>M. thymifolia</i>
Diosmetin	300	19,94	250, 266, 344	299 [M-H] ⁻ / 284	<i>M. thymifolia</i>
Luteolin-(5/7)-metileter	300	23,83	264, 352	299 [M-H] ⁻ / 284,151	<i>M. thymifolia</i>
Akacetin	284	25,15	238, 268, 334	283 [M-H] ⁻ / 268	<i>M. thymifolia</i>



Slika 26. LC-ESI –MS/MS kromatogram 3-(3,4-dihidroksifenil)mlječne kiseline iz ekstrakta vrste *Micromeria croatica* Kolona: Kinetex C-18 (100 x 2,1 mm, 2,8 μ m); pokretna faza: 0,1%-tna mravlja kiselina u vodi (A), u acetonitrilu (B); protok: 250 μ L/min



Slika 27. LC-ESI–MS/MS kromatogram diosmetina iz frakcije ekstrakta vrste *Micromeria thymifolia*

Kolona: Zorbax SB-C18 (150 x 21 mm, 2,8 μ m); pokretna faza: 0,1%-tna mravlja kiselina u vodi (A), u metanolu (B), u acetonitrilu (C);
protok: 400 μ L/min

U okviru ovog doktorskog rada po prvi puta provedeno je opsežno istraživanje fenolnih kiselina i flavonoida u vrstama roda *Micromeria*. Identificirano je 11 fenolnih kiselina i 15 flavonoida (Tablice 10 i 11), a za većinu njih do sada nije potvrđena prisutnost u ispitivanim vrstama roda *Micromeria*. Vrste *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* sadržavale su ružmarinsku, 4-kavenoilkina (kriptoklorogensku), salvianolnu J i 3-(3,4) dihidroksifenilmliječnu kiselinu. Za razliku od ostale dvije, u vrsti *M. croatica* identificirane su kavena te dimer ružmarinske kiseline. Trimer ružmarinske kiseline identificiran je u vrstama *M. croatica* i *M. juliana*, dok je 3-*p*- i 4-*p*-kavenoilkina, salvianolnu B i neoklorogensku kiselinu sadržavala jedino vrsta *M. thymifolia*. Dobiveni rezultati ne podupiru u potpunosti prethodno istraživanje u kojem je RP-HPLC-DAD metodom analiziran sadržaj ružmarinske, klorogenske, kavene i ferulične kiseline u vrstama porodice Lamiaceae, uključujući i neke vrste roda *Micromeria* (Vladimir-Knežević i sur., 2014). Primjenom LC-ESI-MS/MS metode ustanovili smo da su u ove tri vrste umjesto klorogenske kiseline prisutni njeni izomeri. Fenolne kiseline navedene u Tablici 10, izuzev ružmarinske i kavene kiseline, po prvi put su identificirane u vrstama *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia*.

Tablica 10. Usporedni prikaz fenolnih kiselina identificiranih u vrstama roda *Micromeria*

Fenolne kiseline	<i>M. croatica</i>	<i>M. juliana</i>	<i>M. thymifolia</i>
3-(3,4) Dihidroksifenilmliječna kiselina	+	+	+
Kavena kiselina	+		
3-Kavenoilkina kiselina (neoklorogenska)			+
4-Kavenoilkina kiselina (kriptoklorogenska)	+	+	+
3- <i>p</i> -Kumaroilkina kiselina			+
4- <i>p</i> -Kumaroilkina kiselina			+
Ružmarinska kiselina	+	+	+
Dimer ružmarinske kiseline	+		
Trimer ružmarinske kiseline	+	+	
Salvianolna kiselina J	+	+	+
Salvianolna kiselina B			+

Tablica 11 donosi usporedni prikaz flavonoida identificiranih u odabranim vrstama roda *Micromeria*. Ustanovljeno je da vrste *M. croatica* i *M. juliana* sadrže glukuronide luteolina, dok je u vrsti *M. croatica* identificiran i glukuronid apigenina. Pored navedenih flavonskih derivata, prisutnost diosmina potvrđena je u ekstraktu vrste *M. juliana*. U okviru ovog rada po prvi put su provedena istraživanja flavonoida u vrsti *M. croatica*, dok su Skaltsa i suradnici (1994) istraživali flavonoide vrste *M. juliana* i potvrdili prisutnost luteolin-3',7-di-O-glukuronida.

Raznolikošću flavonoida posebice se istaknula vrsta *M. thymifolia* koja je sadržavala sve ostale identificirane flavonoide iz skupine flavona, flavonola i flavanona. Osim već spomenutog diosmina, *M. thymifolia* sadržavala je i aglikone diosmetin i luteolin-5/7-metileter te glikozid apigenina s glukozom ili rutinozom kao šećernim dijelom molekule. Značajna razlika u sastavu flavonoida u odnosu na vrste *M. croatica* i *M. juliana* vidljiva je u identificiranom akacetinu i akacetin-O-acetilglukozil-ramnozil glukozidu. Prethodnim istraživanjima Marin i suradnici (2001) također su ustanovili različitu zastupljenost akacetinskih glikozida u vrstama roda *Micromeria* te ukazali na njihovu važnost u kemotaksonomiji ovog roda. U vrsti *M. thymifolia* identificirani su glikozidi kvercetina (rutin, izokvercitrin) i kemferola (kemferol-3-O-rutinozid, kemferol-3-O-galaktozid/glukozid). Uvidom u prethodna istraživanja može se zaključiti da flavonolski derivati do sada nisu dokazani u ispitivanim vrstama roda *Micromeria*. Također je po prvi put u vrsti *M. thymifolia* identificiran flavanonski glikozid hesperidin (hesperetin-3-O-rutinozid).

Fitokemijska istraživanja vrsta roda *Micromeria* provedena u ovom radu ukazuju na heterogenost sekundarnih metabolita unutar ovog roda te ističu značajnu razliku vrste *M. thymifolia* u odnosu na vrste *M. croatica* i *M. juliana*. Dobiveni rezultati s kemotaksonomskog gledišta doprinose novim istraživanjima o taksonomiji roda *Micromeria* kojima se predlaže svrstavanje vrste *M. thymifolia* u rod *Clinopodium* (Bräuchler i sur., 2008).

Tablica 11. Usporedni prikaz flavonoida identificiranih u vrstama roda *Micromeria*

Flavonoidi	<i>M. croatica</i>	<i>M. juliana</i>	<i>M. thymifolia</i>
Luteolin-5/7-metileter			+
Luteolin-O-glukuronid		+	
Luteolin-O-diglukuronid	+	+	
Luteolin-O-triglukuronid	+	+	
Apigenin-O-glukuronid	+		
Apigenin-O-glukozid/rutinozid			+
Akacetin			+
Akacetin-O-acetilglukozil-ramnozil glukozid			+
Diosmetin			+
Diosmin		+	+
Rutin			+
Izokvercitrin			+
Kemferol-3-O-rutinozid			+
Kemferol-3-O-galaktozid/glukozid			+
Hesperidin			+

4.2 Udjeli fenolnih kiselina u vrstama porodice Lamiaceae

4.2.1 Analiza rezultata prevalidacije farmakopejskih metoda određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata

Europska farmakopeja preporučuje postupke za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenolnih kiselina (hidroksicimetnih derivata ili derivata *orto*-dihidroksicimetne kiseline) u biljnim drogama. Standardni postupak trebao bi biti učinkovit za mjerenje radne mase analita, ispravan u smislu dobivanja vjerodostojnih rezultata analize, i pouzdan, kako bi se osigurala ponovljivost rezultata mjerenja. Stoga je potrebno procijeniti njegovu radnu podobnost i pouzdanost. U monografiji droga *Fraxini folium* i *Rosmarini folium* propisana su dva vrlo slična postupka, s osnovnom razlikom u primjeni standarda prema kojem se izražava rezultat, a to su klorogenska ili ružmarinska kiselina. Metode spektrofotometrijskog određivanja hidroksicimetnih derivata detaljno opisane u Poglavlju 3.3.12 temelje se na reakciji *orto*-dihidroksifenola s nitrit-molibdat reagensom, pri čemu nastaje žuto obojen kompleks koji dodatkom lužine poprima narančastu boju. Apsorbancija se mjeri na 505 nm za ružmarinsku kiselinu i na 525 nm za klorogensku kiselinu. U okviru ovog doktorskog rada provedena je matematičko-statistička prosudba vrijednosti izvedbenih značajki i valjanosti ovih analitičkih postupka (Grdinić i Vuković, 2004).

Unutar radnog područja ružmarinske/klorogenske kiseline 40,00-400,00 µg (x) provedena su 24 mjerenja (N) svrstana u 6 skupina. Mjerenja su provedena pod stalnim radnim i tehničkim uvjetima i za svako mjerenje su dobiveni inicijalni podaci o apsorbanciji slijepe i kompenzacijske otopine te otopine uzorka. Ulazni prevalidacijski podaci bili su količina analita x , apsorbancija slijepog uzorka (B), apsorbancija uzorka (y) te korigirana ili neto apsorbancija (S) koja predstavlja razliku apsorbancije uzorka i slijepog uzorka ($y-B$). Zbog mogućeg utjecaja klorogenske i ružmarinske kiseline na apsorbanciju nastalog kompleksa, prije matematičko-statističke analize signal je korigiran apsorbancijom odgovarajuće količine ružmarinske ili klorogenske kiseline.

4.2.1.1 Karakterizacija analitičkih skupina od 1 do 6

Prvi korak u ovom prevalidacijskom postupku predstavljala je karakterizacija analitičkih skupina 1-6. Srednja vrijednost \bar{y} i stupanj disperzije [standardna devijacija (s) i relativna standardna devijacija (s_r)] korišteni su kao statistički kriteriji u deskriptivnoj statistici za karakterizaciju i usporedbu početnih podataka. Dobivene vrijednosti služile su za procjenu ponovljivosti mjerenja kao dio mjere preciznosti (Tablice 12 i 13). Relativna standardna devijacija apsorbancija slijepih otopina u oba postupka mjerenja pokazala je nisku preciznost. Ipak, variranje slijepih vrijednosti možemo zanemariti jer su izrazito niske u odnosu na signal analita. Nasuprot tome odstupanja dobivena mjerenjem uzorka i korigirane apsorbancije pokazale su visoku preciznost za postupak mjerenja s klorogenskom kiselinom (s_{ry} od $\pm 0,56$ % do $\pm 2,86$ %, s_{rs} od $\pm 0,55$ % do $\pm 2,95$ %) i za postupak mjerenja s ružmarinskom kiselinom (s_{ry} od $\pm 0,95$ % do $\pm 2,12$ %, s_{rs} od $\pm 0,95$ % do $\pm 1,83$ %). Oba postupka mjerenja zadovoljavaju strogi prevalidacijski zahtjev od $s_r < 5\%$ kojeg su postavili Grdinić i Vuković (2004).

Tablica 12. Karakterizacija skupina 1-6 pri određivanju ukupnih hidroksicimetnih derivata izraženih kao klorogenska kiselina

Skupina ^a (j)	x^b (μg)	$\bar{B}/s_B/s_{rB}$ (%)	$\bar{y}/s_y/s_{ry}$ (%)	$\bar{S}/s_s/s_{rs}$ (%)	$\bar{A}^c/s_A/s_{rA}$ (%)
1	400	0,0028/ $\pm 0,0005$ / $\pm 18,2$	0,816/ $\pm 0,005$ / $\pm 0,56$	0,814/ $\pm 0,005$ / $\pm 0,55$	0,0020/ $\pm 0,00001$ / $\pm 0,55$
2	320	0,0013/ $\pm 0,0005$ / $\pm 40,0$	0,677/ $\pm 0,012$ / $\pm 1,87$	0,676/ $\pm 0,013$ / $\pm 1,85$	0,0021/ $\pm 0,00004$ / $\pm 1,85$
3	240	0,0028/ $\pm 0,0005$ / $\pm 18,2$	0,499/ $\pm 0,011$ / $\pm 2,19$	0,496/ $\pm 0,011$ / $\pm 2,12$	0,0021/ $\pm 0,00004$ / $\pm 2,12$
4	160	0,0015/ $\pm 0,0006$ / $\pm 38,5$	0,329/ $\pm 0,008$ / $\pm 2,28$	0,327/ $\pm 0,007$ / $\pm 2,25$	0,0020/ $\pm 0,00005$ / $\pm 2,25$
5	80	0,0028/ $\pm 0,0005$ / $\pm 18,2$	0,163/ $\pm 0,005$ / $\pm 2,86$	0,160/ $\pm 0,005$ / $\pm 2,95$	0,0020/ $\pm 0,00006$ / $\pm 2,95$
6	40	0,0030/ $\pm 0,0008$ / $\pm 27,2$	0,083/ $\pm 0,002$ / $\pm 2,10$	0,080/ $\pm 0,002$ / $\pm 2,62$	0,0020/ $\pm 0,00005$ / $\pm 2,62$
\bar{s} (\bar{s}_r , %)		$\pm 0,0006$ ($\pm 28,3$)	$\pm 0,008$ ($\pm 2,10$)	$\pm 0,008$ ($\pm 2,19$)	$\pm 0,044$ ($\pm 2,19$)

^a Ukupni broj mjerenja, $N=72$, uključuje 24 mjerenja slijepih, standarda i kompenzacijskih otopina

^b Količina klorogenske kiseline

^c Pojedinačna vrijednost osjetljivosti, $A_n = S_n/x_n$

B – slijepa otopina

y –signal

S – ispravljeni signal

s –standardna devijacija

s_r – relativna standardna devijacija

Tablica 13. Karakterizacija skupina 1-6 pri određivanju ukupnih hidroksicimetnih derivata izraženih kao ružmarinska kiselina

Skupina ^a (j)	x^b (μg)	$\bar{B}/s_B/s_{rB}$ (%)	$\bar{y}/s_y/s_{ry}$ (%)	$\bar{S}/s_S/s_{rs}$ (%)	$\bar{A}^c/s_A/s_{rA}$ (%)
1	400	0,0010/±0,00005/±4,88	1,327/±0,015/±1,15	1,325/±0,015/±1,15	0,0033/±0,0004/±1,15
2	320	0,0013/±0,00005/±4,88	1,057/±0,010/±0,95	1,055/±0,010/±0,95	0,0033/±0,0003/±0,95
3	240	0,0010/±0,00005/±4,88	0,788/±0,008/±1,01	0,786/±0,008/±1,01	0,0033/±0,0003/±1,01
4	160	0,0010/±0,00005/±4,88	0,547/±0,010/±1,74	0,546/±0,010/±1,75	0,0034/±0,0006/±1,75
5	80	0,0010/±0,00005/±4,88	0,267/±0,004/±1,58	0,265/±0,004/±1,58	0,0033/±0,0005/±1,58
6	40	0,0023/±0,0010/±42,55	0,139/±0,003/±2,12	0,137/±0,003/±1,83	0,033/±0,0004/±1,83
\bar{s} (\bar{s}_r , %)		±0,004 (±17,93)	±0,009 (±1,49)	±0,009 (±1,42)	±0,00004 (±1,42)

^a Ukupni broj mjerenja, N =72, uključuje 24 mjerenja slijepih, standardnih i kompenzacijskih otopina

^b Masa ružmarinske kiseline

^c Pojedinačna vrijednost osjetljivosti, $A_n = S_n/x_n$

B – slijepa otopina

y –signal

S – ispravljeni signal

s –standardna devijacija

s_r – relativna standardna devijacija

4.2.1.2 Provjera graničnih skupina 1 i 6

Prognostička matematičko-statistička prosudba podataka započeta je ispitivanjem graničnih skupina radnog područja analita, odnosno skupina 1 i 6. Posebna pozornost bila je usmjerena na kontrolu kakvoće mjerenja unutar skupina s najmanjom količinom ružmarinske/klorogenske kiseline (x_6) jer slučajna kolebanja slijepih mjerenja mogu značajno utjecati na pouzdanost analitičke metode. U ovim postupcima za određivanje ukupnih hidroksicimetnih derivata slijepi signal je znatno niži od korigiranog signala analita u skupini x_6 . Iako su devijacije slijepih mjerenja visoke, utjecaj na standardnu devijaciju analitičke metode određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata (s_M) se ne očekuje budući da su slijepi signali puno slabiji u usporedbi sa signalom analita (Tablica 14, Zahtjev R2). Standardne devijacije grubog i korigiranog signala ispod ±2,5 % na donjoj granici radnog područja i ispod ±25 % na gornjoj granici radnog područja upućuju na prag dokazivanja ispod x_6 , odnosno donje granice radnog područja analita. Dodatna provjera sposobnosti sustava da razluči slijepe signale od signala analita pokazala je odličnu sposobnost razlučivanja signala (Tablica 14, zahtjev R4). Predispitivanje linearnosti baždarnе funkcije temeljeno je na pretpostavci linearnosti. R vrijednost bila je manja od zadane vrijednosti t ($R < 3,707$, Tablica 14, zahtjev R5), pa se očekuje linearna baždarna krivulja.

Tablica 14. Provjera graničnih skupina 1 i 6

Zahtjev broj	Rezultati		Dijagnoza
	K-UHD	R-UHD	
R1	$AC = 27,5$	$AC = 61,8$	Slijepi signal je niži od signala u skupini s najnižim sadržajem analita x_L
R2	$R = 265,0\%$	$R = 607,8\%$	Utjecaj rasapa slijepih vrijednosti na standardno odstupanje postupka s_M je zanemariv
	$s_{rB1} = \pm 18,2\%$	$s_{rB1} = \pm 4,9\%$	
	$s_{rB6} = \pm 27,2\%$	$s_{rB6} = \pm 42,6\%$	
R3	$s_{ry6} = \pm 2,10\%$	$s_{ry6} = \pm 2,12\%$	Prag dokazivanja je niži od donje granice radnog područja analita x_6
	$s_{rS6} = \pm 2,62\%$	$s_{rS6} = \pm 1,83\%$	
	$s_{ry1} = \pm 0,56\%$	$s_{ry1} = \pm 1,15\%$	
	$s_{rS1} = \pm 0,55\%$	$s_{rS1} = \pm 1,15\%$	
	$s_{r6} < 2,5\%; s_{r1} < 2,5\%$	$s_{r6} < 2,5\%; s_{r1} < 2,5\%$	
R4	$R = 31,1$	$R = 35,1$	Odlična sposobnost razlučivanja signala
R5	$R = 1,74$	$R = 2,87$	Očekuje se linearna baždarna funkcija

K-UHD – postupak određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata uz kolorogensku kiselinu kao standard

R-UHD – postupak određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata uz ružmarinsku kiselinu kao standard

 s_r – relativna standardna devijacija

4.2.1.3 Provjera homogenosti podataka

Ispitivanje homogenosti podataka provedeno je jednostavnom analizom varijance (ANOVA) i Barlettovim ispitivanjem. Primjena ANOVA-e na varijance slijepih vrijednosti ukazala je na nehomogene slijepe vrijednosti u metodi određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata koji koriste kao standard klorogensku ($R=6,80$) i ružmarinsku kiselinu ($R=6,46$). Ukoliko je omjer s_{Bb}^2 i s_{Bw}^2 (R) veći od teorijske vrijednosti F (Tablica 15, zahtjev R6, $F=2,77$; $R < F$) vrijednost ukazuje na nehomogenost slijepih vrijednosti, pa se slučajne greške ne mogu isključiti. Dodatna provjera ponovo je pokazala da se utjecaj slijepih mjerenja u obje metode može zanemariti budući da su vrijednosti značajno manje u usporedbi s vrijednostima analita x_I (Tablica 15, zahtjev R7). Ukupna s_r vrijednost za slijepa mjerenja (37,2% i 47,4%) udovoljava prevalidacijskim kriterijima koji zahtijevaju vrijednost manju od 50% (Tablica 15, zahtjev R8). Iako je kolebanje slijepih vrijednosti u obje metode veliko, njihove niske vrijednosti neće imati utjecaja na metodu. Ukoliko su zadovoljeni kriteriji R6 i/ili R7 i R8 za obje metode tada se grube vrijednosti signala (y) korigiraju s ukupnom srednjom vrijednosti \bar{B}_N . Za provjeru homogenosti s i s_r vrijednosti za slijepe vrijednosti (B), grube vrijednosti (y), korigirane vrijednosti signala (S), vrijednosti osjetljivosti (A) i prividne mase analita (\hat{x})

korišteno je Bartlettovo ispitivanje. Testiranje je pokazalo da je većina s i s_r vrijednosti strogo homogena. Nehomogene s i s_r vrijednosti nađene su samo za slijepe vrijednosti u metodi određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata koja koristi kao standard ružmarinsku kiselinu (Tablica 15, zahtjev R9).

Tablica 15. Provjera homogenosti podataka

Zahtjev broj	Rezultati		Dijagnoza
	K-UHD	R-UHD	
R6	$s_{Bw}^2 = 2,27 \times 10^{-6}$ $s_{Bb}^2 = 3,33 \times 10^{-7}$ $R = 6,80$	$s_{Bw}^2 = 1,00 \times 10^{-6}$ $s_{Bb}^2 = 1,55 \times 10^{-7}$ $R = 6,46$	Slijepe vrijednosti su nehomogene
R7	$\overline{B}_N < 0,0041$ $\overline{B}_N = 0,0023$	$\overline{B}_N < 0,0066$ $\overline{B}_N = 0,0012$	Utjecaj slijepih vrijednosti je zanemariv
R8	$s_{rBN} = 37,2\%$ $s_{BN} = 8,68 \times 10^{-4}$	$s_{rBN} = 47,4\%$ $s_{BN} = 5,82 \times 10^{-4}$	
R9	$R(s_B) = 1,22, \text{ s.h.}$ $R(s_{rB}) = 3,82, \text{ s.h.}$ $R(s_y) = 10,11, \text{ s.h.}$ $R(s_{ry}) = 5,30, \text{ s.h.}$ $R(s_s) = 8,94, \text{ s.h.}$ $R(s_{rs}) = 5,73, \text{ s.h.}$ $R(s_A) = 5,56, \text{ s.h.}$ $R(s_{rA}) = 5,73, \text{ s.h.}$	$R(s_B) = 50,1, \text{ nh.}$ $R(s_{rB}) = 30,0, \text{ nh.}$ $R(s_y) = 7,83, \text{ s.h.}$ $R(s_{ry}) = 2,77, \text{ s.h.}$ $R(s_s) = 8,65, \text{ s.h.}$ $R(s_{rs}) = 2,10, \text{ s.h.}$ $R(s_A) = 2,34, \text{ s.h.}$ $R(s_{rA}) = 2,10, \text{ s.h.}$	

K-UHD – postupak određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata uz kolorogensku kiselinu kao standard

R-UHD – postupak određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata uz ružmarinsku kiselinu kao standard

s.h. – strogo homogen; nh – nehomogen

s_{Bw}^2 - rasap slijepih mjerenja unutar skupine; s_{Bb}^2 - rasap slijepih mjerenja između skupina; R – omjer s_{Bb}^2 i s_{Bw}^2

\overline{B}_N - ukupna srednja vrijednost; s_{rBN} - ukupna relativna standardna devijacija slijepih mjerenja

s_{BN} - ukupna standardna devijacija slijepih mjerenja

4.2.1.4 Provjera odnosa analit-signal

Karakteristični podaci koje dobivamo ovim ispitivanjem su: koeficijent korelacije (r), odsječak na y-osi (a), koeficijent smjera (b), standardno odstupanje odsječka na y-osi (s_a) i standardno odstupanje koeficijenta smjera (s_b) (Tablica 16). Veličine a i b su konstante kalibracijske krivulje, a centroid svih točaka je položaj aritmetičke sredine svih signala (S_N) i aritmetičke sredine svih vrijednosti mase analita (x_N). Izračunata vrijednost R bila je veća od

vrijednosti t , što prema zahtjevu R11 ($R > t = 2,819$) ukazuje na značajnost koeficijenta korelacije. Linearnost metode određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata koji koriste kao standard klorogensku i ružmarinsku kiselinu ispitan je metodom najmanjih kvadrata. Za metodu s klorogenskom kiselinom dobivena je jednačba pravca $A = 0,0021x - 0,0029$, uz koeficijent korelacije $r^2 = 0,9992$, a za metodu s ružmarinskom kiselinom $A = 0,0033x + 0,0063$, uz $r^2 = 0,9997$. Konstante kalibracijske (V) i prosudbene analitičke funkcije (V), srednje vrijednosti pogrešaka konstanti (s_V i s_V) i standardno odstupanje analitičke metode (s_M) utvrđene su t-testom, pri čemu je za oba postupka dobivena idealna kalibracijska i prosudbena analitička funkcija (Tablica 16, zahtjev R13 i R14).

Tablica 16. Kakvoća odnosa sadržaj analita – analitički signal kao standard

Zahtjev broj	Rezultati		Dijagnoza
	K-UHD	R-UHD	
R10	$r = 0,9992$ $b = 0,0021$ $a = -0,0029$ $s_y = \pm 0,0027$ $s_b = \pm 0,00008$ $s_a = \pm 0,0011$ centroid = (206,7;0,425)	$r = 0,9997$ $b = 0,0033$ $a = 0,0063$ $s_y = \pm 0,0031$ $s_b = \pm 0,0009$ $s_a = \pm 0,0012$ centroid = (206,7;0,686)	
R11	$R = 116,3$	$R = 182,3$	Korelacija značajna
R12	$\pm C_b = 0,0021 \pm 0,0002$ $\pm C_a = -0,0029 \pm 0,0030$ t-ispitivanje na realnost konstanti kalibracijske funkcije	$\pm C_b = 0,0033 \pm 0,0003$ $\pm C_a = 0,0063 \pm 0,0031$	
R13	$V = 0,0021$ $R_V = 223,4$ $s_V = \pm 0,00001$ $s_M = \pm 0,0110$ $\hat{S} = 0,0021x$ t-ispitivanje na realnost konstanti prosudbene analitičke funkcije	$V = 0,0033$ $R_V = 342,7$ $s_V = \pm 0,00001$ $s_M = \pm 0,012$ $\hat{S} = 0,0033x$	Idealna kalibracijska funkcija
R14	$V = 484,9$ $R_V = 223,4$ $s_V = 2,17$ $s_M = 5,32$ $\hat{x} = 484,9S$	$V = 302,0$ $R_V = 342,7$ $s_V = 0,88$ $s_M = 3,47$ $\hat{x} = 302,0S$	Idealna prosudbena analitička funkcija

R-UHD – postupak određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata uz ružmarinsku kiselinu kao standard

K-UHD – postupak određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata uz klorogensku kiselinu kao standard

4.2.1.5 Prepoznavanje bjegunaca

Postupak prepoznavanja bjegunaca ima svrhu provjere razlikuje li se mjerenje značajno od ostalih podataka u setu signala (S) koji su korišteni za procjenu kalibracijske funkcije i u setu mase klorogenske ili ružmarinske kiseline (x) koji je korišten za procjenu prosudbene analitičke funkcije. Testiranje je provedeno usporedbom $|S^*|$ i $|x^*|$ vrijednosti s t-vrijednostima za pouzdanost $p = 95\%$ i 99% . U obje metode otkriven je po jedan bjegunac, što ne utječe na kakvoću mjerenja (Tablica 17).

Tablica 17. Prepoznavanje bjegunaca

Zahtjev broj	Rezultati		Dijagnoza
	K-UHD	R-UHD	
R15	$S_5^* = 2.50$	$S_{13}^* = 2.46$	Jedan bjegunac, nema utjecaja na kakvoću mjerenja
	$2.807 > S_5^* > 2.069$	$2.807 > S_{13}^* > 2.069$	Jedan bjegunac, nema utjecaja na kakvoću mjerenja
	$x_5^* = 2.47$	$x_{13}^* = 2.45$	
	$2.807 > x_5^* > 2.069$	$2.807 > x_{13}^* > 2.069$	

K-UHD – postupak određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata uz klorogensku kiselinu kao standard

R-UHD – postupak određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata uz ružmarinsku kiselinu kao standard

S^* - bjegunci u setu signala

x^* - bjegunci u setu količine analita

4.2.1.6 Prosudba graničnih vrijednosti

Granične vrijednosti, kao što su granična vrijednost neto signala (S_D), prag dokazivanja (L_D) i prag određivanja (L_Q) prikazane su u Tablici 18. Za obje metode sve granične vrijednosti bile su značajno niže od količine klorogenske/ružmarinske kiseline u skupini s najmanjom količinom analita ($< 40 \mu\text{g}$). Iz ovih rezultata vidljivo je da se vrlo mala masa klorogenske i još manja masa ružmarinske kiseline mogu odrediti ispitivanom metodom.

Tablica 18. Prosudba graničnih vrijednosti

Zahtjev broj	Rezultati		Dijagnoza
	K-UHD	R-UHD	
R16	$S_D = 0,0038$	$S_D = 0.0022$	$S_D < S_6$
	$L_D = 1,75 \times 10^{-4} \text{ mg}$	$L_D = 0,53 \times 10^{-4} \text{ mg}$	$L_D < x_6$
	$L_Q = 4,21 \times 10^{-3} \text{ mg}$	$L_Q = 1,76 \times 10^{-3} \text{ mg}$	$L_Q < x_6$

K-UHD – postupak određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata uz klorogensku kiselinu kao standard

R-UHD – postupak određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata uz ružmarinsku kiselinu kao standard

4.2.1.7 Metrološke karakteristike metode određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata

U konačnici su kalibracijske i analitičke evaluacijske funkcije upotrijebljene kako bi odredili prividne vrijednosti signala i prividnu masu klorogenske/ružmarinske kiseline (Tablica 19 i 20). Podaci o točnosti metode dodatno su dobiveni usporedbom teorijske i nađene mase analita. Raspon slučajnih odstupanja, kao mjera preciznosti metode određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata koja koristi kao standard klorogensku kiselinu, iznosila je od $\pm 0,55\%$ do $\pm 2,95\%$. Sustavna odstupanja, kao mjera točnosti, bila su od $-3,62\%$ do $+2,36\%$. Za metodu određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata koja koristi kao standard ružmarinsku kiselinu vrijednosti su bile sljedeće: $s_{\hat{x}}$ vrijednost varirala je od $\pm 0,95\%$ do $\pm 1,82\%$, a $\Delta\bar{x}$ od $-1,05\%$ do $3,23\%$.

Tablica 19. Preciznost i točnost metode određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata koja koristi kao standard klorogensku kiselinu

Količina klorogenske kiseline (μg)						
Teorijska	400,0	320,0	240,0	160,0	80,0	40,0
Nađena	394,5	327,6	240,4	158,7	77,5	38,6
Slučajna odstupanja						
$s_{\hat{x}} (\mu\text{g})$	$\pm 2,17$	$\pm 6,06$	$\pm 5,09$	$\pm 3,57$	$\pm 2,29$	$\pm 1,01$
$s_{r\hat{x}} (\%)$	$\pm 0,55$	$\pm 1,85$	$\pm 2,12$	$\pm 2,25$	$\pm 2,95$	$\pm 2,62$
Sustavna odstupanja						
$\Delta\bar{x} (\mu\text{g})$	-5,52	+7,56	+0,40	-1,31	-2,53	-1,45
$\Delta\bar{x} (\%)$	-1,38	+2,63	+0,17	-0,82	-3,17	-3,62

$\Delta\bar{x}$ - razlika između teoretske (x) i nađene (\hat{x}) vrijednosti

Tablica 20. Preciznost i točnost metode određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata koja koristi kao standard ružmarinsku kiselinu

Količina ružmarinske kiseline (μg)						
Teorijska	400,0	320,0	240,0	160,0	80,0	40,0
Nađena	400,2	318,7	237,5	164,9	80,2	41,3
Slučajna odstupanja						
$s_{\hat{x}}$ (μg)	$\pm 4,61$	$\pm 3,03$	$\pm 2,41$	$\pm 2,89$	$\pm 1,27$	$\pm 0,75$
$s_{r\hat{x}}$ (%)	$\pm 1,15$	$\pm 0,95$	$\pm 1,01$	$\pm 1,75$	$\pm 1,58$	$\pm 1,82$
Sustavna odstupanja						
$\Delta\bar{x}$ (μg)	+0,24	-1,29	-2,52	+4,93	+0,16	+1,29
$\Delta\bar{x}$ (%)	+0,06	-0,40	-1,05	+3,09	+0,20	+3,23

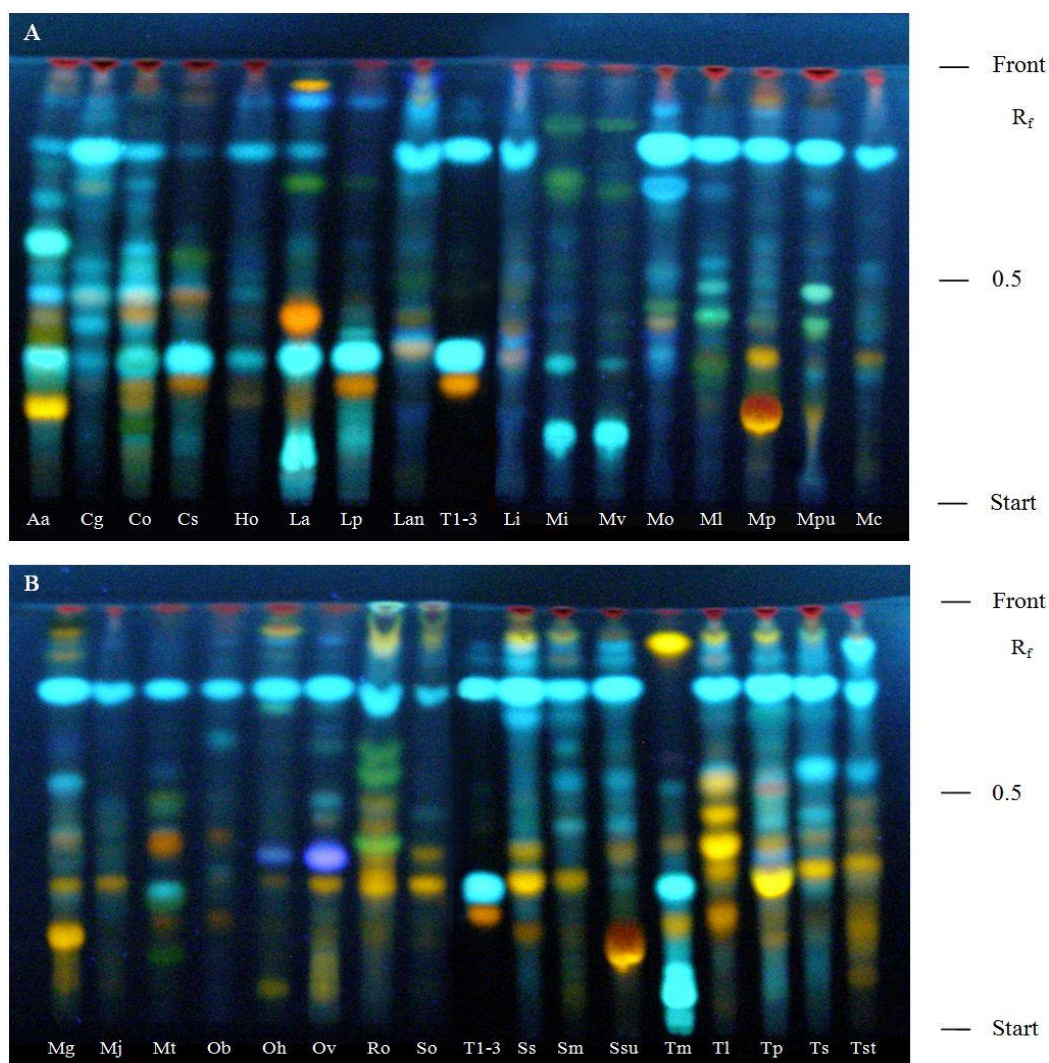
$\Delta\bar{x}$ - razlika između teoretske (x) i nađene (\hat{x}) vrijednosti

Dobra kvaliteta mjerenja u skupini s najmanjom količinom analita, odlično razlučivanje slijepog signala od signala analita, uglavnom homogeni podaci, idealna linearna kalibracijska i analitička prosudbena funkcija, vrlo dobro podudaranje teorijskih i nađenih količina klorogenske, odnosno ružmarinske kiseline, vrlo niske granične vrijednosti te visoka preciznost i točnost potvrđuju visoku kvalitetu metode određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata koja koristi kao standard klorogensku i ružmarinsku kiselinu. Stoga se ove dvije farmakopejske metode mogu uspješno primijeniti za određivanje ukupnih hidroksicimetnih derivata. Nešto veća osjetljivost metode koja koristi kao standard ružmarinsku kiselinu predstavlja prednost pri odabiru ove metode. Nedostatak zamijećen u obje metode je kolebanje slijepih vrijednosti, međutim, ne očekuje se utjecaj na kvalitetu metode jer su njihove vrijednosti niske u usporedbi s analitom.

4.2.2. Primjena prevalidiranih metoda za određivanje hidroksicimetnih derivata

4.2.2.1 Prisutnost klorogenske i ružmarinske kiseline u odabranim vrstama porodice Lamiaceae

Kvalitativna analiza hidroksicimetnih derivata u metanolnim ekstraktima 32 odabrane vrste porodice Lamiaceae provedena je tankoslojnom kromatografijom. Odjeljivanje fenolnih kiselina na tankom sloju silikagela postignuto je primjenom smjese diizopropil etera, acetona, vode i mravlje kiseline u volumnim omjerima 5:3:1:1. Nakon prskanja NST/PEG reagensom i promatranja pod UV svjetlom pri 365 nm detektirane su zone svijetloplave fluorescencije fenolnih kiselinah te narančasto, žuto i zeleno fluorescirajuće zone flavonoida (Slika 28). U većini ispitanih ekstrakata dominirala je svijetloplava zona ($R_F = 0,79$) koja odgovara ružmarinskoj kiselini. Prisutnost ove kiseline nije ustanovljena jedino u vrstama *Lamium purpureum*, *Marrubium incanum*, *M. vulgare* i *Teucrium montanum*. Klorogenska kiselina ($R_F = 0,33$) pokazala se kao glavna hidroksicimetna kiselina u ekstraktima vrsta *Calamintha officinalis*, *C. sylvatica*, *Lamium album*, *L. purpureum* i *Teucrium montanum*.



Slika 28. Kromatogrami fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima odabranih vrsta porodice Lamiaceae

Nepokretna faza: Kiselelgel 60 F₂₅₄ HPTLC ploča

Pokretna faza: diizopropil eter-aceton-voda-mravljja kiselina 5:3:1:1 (V/V/V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

Poredbene supstancije: T1-3 – rutin ($R_f = 0,26$); klorogenska kiselina ($R_f = 0,33$); ružmarinska kiselina ($R_f = 0,79$)

Metanolni biljni ekstrakti – biljne vrste prema kraticama navedene u Tablici 21

4.2.2.2. Udjeli ukupnih hidroksicimetnih derivata u odabranim vrstama porodice Lamiaceae

Prevalidiranim spektrofotometrijskim metodama određeni su udjeli ukupnih hidroksicimetnih derivata (derivata *orto*-dihidroksicimetne kiseline) u listovima, cvjetovima i nadzemnim djelovima 32 odabrane vrste porodice Lamiaceae. Ovisno o prethodno provedenoj kvalitativnoj analizi, primijenjen je postupak koji koristi kao standard klorogensku ili ružmarinsku kiselinu. Iz Tablice 21 vidljivo je da se ispitane vrste značajno razlikuju prema udjelima hidroksicimetnih derivata koji su bili u širokom rasponu od 1,95% (*Acinos arvensis*) do 11,3% (*Satureja subspicata*). Osim vrste *Satureja subspicata*, visokim udjelima hidroksicimetnih derivata isticale su se i vrste *Micromeria graeca* (9,92%), *M. croatica* (7,90%), *M. thymifolia* (7,67%), *Melissa officinalis* (9,86 %), *Origanum vulgare* (8,31%) i *O. heracleoticum* (7,68%). Dobiveni rezultati ukazali su na visoke udjele fenolnih kiselina u vrstama porodice Lamiaceae rasprostranjenih u Hrvatskoj, što ih svrstava u bogate izvore bioaktivnih polifenolnih sastavnica, posebice ružmarinske i klorogenske kiseline.

Tablica 21. Udjeli hidroksicimetnih derivata izraženih kao klorogenska ili ružmarinska kiselina. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija triju neovisnih mjerenja.

Vrsta	Kratica	Dio biljke	Sadržaj (%) \pm SD	
			Klorogenska kiselina	Ružmarinska kiselina
<i>Acinos arvensis</i> (Lam.) Dandy	Aa	Nadzemni dio	1,95 \pm 0,15	
<i>Calamintha grandiflora</i> (L.) Moench	Cg	Nadzemni dio		3,99 \pm 0,03
<i>Calamintha officinalis</i> Moench	Co	Nadzemni dio	4,01 \pm 0,16	
<i>Calamintha sylvatica</i> Bromf.	Cs	Nadzemni dio	7,13 \pm 0,11	
<i>Hyssopus officinalis</i> L.	Ho	Cvijet	3,95 \pm 0,06	
<i>Lamium album</i> L.	La	Cvijet	6,40 \pm 0,34	
<i>Lamium purpureum</i> L.	Lp	Cvijet	3,56 \pm 0,05	
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Lan	Cvijet		2,89 \pm 0,07
<i>Lavandula x intermedia</i> Emeric ex Lois.	Li	Cvijet		4,17 \pm 0,04
<i>Marrubium incanum</i> Desr.	Mi	Nadzemni dio	2,08 \pm 0,05	
<i>Marrubium vulgare</i> L.	Mv	Nadzemni dio	2,21 \pm 0,10	
<i>Melissa officinalis</i> L.	Mo	List		9,86 \pm 0,05
<i>Mentha longifolia</i> (L.) Huds	MI	List		5,73 \pm 0,28
<i>Mentha x piperita</i> L.	Mp	List		6,80 \pm 0,19
<i>Mentha pulegium</i> L.	Mpu	Nadzemni dio		5,17 \pm 0,14
<i>Micromeria croatica</i> (Pers.) Schott	Mc	Nadzemni dio		7,90 \pm 0,24
<i>Micromeria graeca</i> (L.) Benth. Ex Reich.	Mg	Nadzemni dio		9,92 \pm 0,07
<i>Micromeria juliana</i> (L.) Benth. Ex Reich	Mj	Nadzemni dio		4,49 \pm 0,03
<i>Micromeria thymifolia</i> (Scop) Fritsch	Mt	Nadzemni dio	7,67 \pm 0,22	
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Ob	Nadzemni dio		3,47 \pm 0,07
<i>Origanum heracleoticum</i> L.	Oh	Nadzemni dio		7,68 \pm 0,06
<i>Origanum vulgare</i> L.	Ov	Nadzemni dio		8,31 \pm 0,11
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Ro	List		5,27 \pm 0,11
<i>Salvia officinalis</i> L.	So	List		3,46 \pm 0,11
<i>Salvia sclarea</i> L.	Ss	List		4,95 \pm 0,09
<i>Satureja montana</i> L.	Sm	Nadzemni dio		5,51 \pm 0,05
<i>Satureja subspicata</i> Bartl. Ex Vis	Ssu	Nadzemni dio		11,03 \pm 0,04
<i>Teucrium montanum</i> L.	Tm	Nadzemni dio	8,20 \pm 0,24	
<i>Thymus longicaulis</i> C. Presl	TI	Nadzemni dio		5,48 \pm 0,17
<i>Thymus pulegioides</i> L.	Tp	Nadzemni dio		6,59 \pm 0,10
<i>Thymus serpyllum</i> L. supsp. <i>serpyllum</i>	Ts	Nadzemni dio		4,55 \pm 0,04
<i>Thymus striatus</i> Vahl	Tst	Nadzemni dio		3,13 \pm 0,05

4.3 Biološki učinci fenolnih kiselina i odabranih vrsta roda *Micromeria*

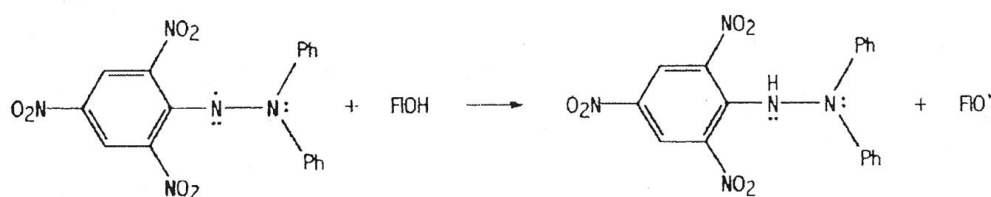
4.3.1 Antioksidacijski učinak

Oksidacijski stres se definira kao neravnoteža između stvaranja slobodnih radikala (*reactive oxygen species* – ROS) i njihove eliminacije putem zaštitnih mehanizama. Ova neravnoteža vodi do oštećenja biomolekula i stanica, s potencijalnim učinkom na cijeli organizam. Oksidacijski stres negativno utječe na strukturu i funkciju lipida, proteina, ugljikohidrata i DNA u stanicama i tkivima, što rezultira oštećenjem membrana, fragmentacijom ili nasumičnim unakrsnim povezivanjem molekula poput DNA, oštećenjem enzima i strukturnih proteina, te može dovesti do stanične smrti uzrokovane fragmentacijom DNA i lipidnom peroksidacijom. Ove posljedice oksidacijskog stresa temelj su molekularne osnove u razvoju kardiovaskularnih oboljenja, raka, neurodegenerativnih poremećaja, dijabetesa i autoimunih bolesti. ROS su produkti normalnog staničnog metabolizma i imaju važnu ulogu u stimulaciji signalnih staničnih puteva koji se aktiviraju kao odgovor na promjene u unutarstaničnim i vanstaničnim uvjetima. U metaboličkim reakcijama aerobne stanice stvaraju superoksid anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikal (OH^{\cdot}), vodikov peroksid (H_2O_2) i organske perokside kao normalne produkte redukcije molekularnog kisika. (Vladimir-Knežević i sur., 2012). Stoga možemo zaključiti da, iako je kisik neophodan za aerobne organizme, proizvodnja ROS može uzrokovati oksidacijski stres koji je ili rezultat prekomjerne produkcije ROS ili smanjenog sustava antioksidacijske obrane. Kako je kisik sveprisutan i neophodan za oksidacijski metabolizam bilo kojeg aerobnog organizma, oksidacijski stres često nastaje zbog različitih stresnih stanja. Toksičnost kisika zahtijeva učinkovit obrambeni mehanizam koji će održati oksidacijsku homeostazu i osigurati preživljavanje stanice, posebice jer se ROS stvaraju u fiziološkim uvjetima. Općenito antioksidacijski sustav obrane možemo podijeliti na enzimski koji uz pomoć raznih enzima detoksicira ROS i neenzimski kojeg čine molekule poput glutationa, vitamina C i E, flavonoida i dr. (Augustyniak i sur., 2010). Predloženo je nekoliko mehanizama koji objašnjavaju antioksidacijsku aktivnost polifenolnih spojeva, a oni uključuju nespecifične mehanizme koji su uglavnom povezani s prisutnošću fenolnih skupina te specifične mehanizme za koje su odgovorni pojedini polifenoli s točno određenom kemijskim i strukturnim obilježjima. Nespecifični mehanizmi podrazumijevaju, primjerice, reakcije hvatanja slobodnih radikala i keliranje metala te interakciju polifenola s membranama, dok

specifičnim mehanizmima smatramo interakciju polifenola s enzimima i transkripcijskim faktorima (Fraga i sur., 2010). U okviru ovog rada ispitan je antioksidacijski potencijal 14 fenolnih kiselina te etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Micromeria* primjenom različitih spektrofotometrijskih metoda kako bi se mogli pretpostaviti mogući mehanizmi njihova antioksidacijskog djelovanja.

4.3.1.1 Antiradikalna aktivnost

Antiradikalna aktivnost hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina ispitana je primijenjenom DPPH[•] metode koja se temelji na određivanju sposobnosti hvatanja slobodnog radikala, odnosno doniranja vodika. DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) je stabilni slobodni radikal koji zbog svog nesparenog elektrona jako apsorbira u vidljivom dijelu spektra (ljubičasta boja) pri valnoj duljini od 517 nm. Antiradikalna aktivnost ispitivanog spoja očituje se obezbojenjem otopine DPPH[•] radikala koje je posljedica njegove redukcije i mjeri se spektrofotometrijski. Reakcija se može prikazati na sljedeći način:



Slika 29. Redukcija DPPH radikala

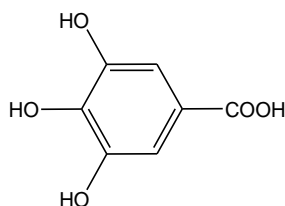
Pri pregledu dosadašnjih istraživanja antiradikalnih svojstava fenolnih kiselina uočeno je da se najviše radova odnosi na ispitivanje mogućnosti hvatanja DPPH radikala. Nedostatak literaturnih podataka vidljiv je u neujednačenosti metoda određivanja hvatanja slobodnih radikala koje se razlikuju u koncentracijama reagensa, ukupnom volumenu ispitivane reakcijske smjese te vremenu inkubacije. Teixeira i suradnici (2013) uočili su povezanost redoks potencijala i antiradikalnog učinka fenolnih kiselina, pri čemu je sposobnost *p*-kumarinske, kavene, ferulične i sinapinske kiseline da inhibira 50% slobodnih DPPH radikala zabilježena pri koncentracijama 100 μM, 16,6 μM, 44,6 μM i 32,2 μM, što odgovara masenim koncentracijama 16,40 μg/mL, 2,99 μg/mL, 8,86 μg/mL i 32,20 μg/mL. Erkan i suradnici (2008) su u sklopu istraživanja antioksidacijskog djelovanja ružmarina ispitali i sposobnost hvatanja DPPH radikala za ružmarinsku kiselinu te dobili EC₅₀ vrijednost od 72,3 μM, što odgovara 2,60 μg/mL. Sličnu EC₅₀ vrijednost od 2,90 μg/mL ustanovio je i Tepe

(2008). Primjenom DPPH metode Villaño i suradnici (2007) odredili su sljedeće EC_{50} vrijednosti: galna kiselina 5,1 μM (0,86 $\mu\text{g/mL}$), siringična 12,3 μM (2,44 $\mu\text{g/mL}$), kavena 12,1 μM (2,20 $\mu\text{g/mL}$) i ferulična 24,7 μM (4,79 $\mu\text{g/mL}$). Novija istraživanja antiradikalnih učinaka proveli su Sevgi i suradnici (2015) ispitujući sposobnost hvatanja DPPH radikala za deset fenolnih kiselina. Kavena, klorogenska, ferulična, galna, *p*-hidroksibenzojeva, ružmarinska, siringična i vanilinska kiselina postigle su svoju EC_{50} vrijednost u koncentraciji oko 100 $\mu\text{g/mL}$, što znatno odstupa od naših niže prikazanih rezultata. Nićifirović i Abramaović (2014) su u preglednom radu zabilježili kako sinapinska kiselina u koncentraciji od 20 μM (odgovara 4,48 $\mu\text{g/mL}$) inhibira 33,2% DPPH radikala, dok je podatak druge skupine istraživača dao EC_{50} vrijednost sinapinske kiseline od 0,3 mM (67 $\mu\text{g/mL}$). Kiliç i Yeşiloğlu (2013) ispitati su antiradikalni učinak *p*-kumarinske kiseline te ustanovili da u koncentraciji 30 $\mu\text{g/mL}$ inhibira 55,6% DPPH radikala. Wang i suradnici (2011) dokazali su antiradikalno djelovanje izoferulične kiseline ($EC_{50} = 4,58 \mu\text{g/mL}$).

U Tablici 22 prikazani su rezultati ispitivanja antiradikalne aktivnosti hidroksibenzojevih kiselina. U tu svrhu pripremljeni su nizovi razrjeđenja od 100 $\mu\text{g/mL}$ do 0,19 $\mu\text{g/mL}$. Nakon mjerenja apsorbancija na 517 nm, izračunate su vrijednosti inhibicije DPPH radikala izražene u postocima. Najjače su djelovale galna i siringična kiselina koje su već pri koncentraciji od 6,25 $\mu\text{g/mL}$ pokazale antiradikalnu aktivnost veću od 90%. Iz rezultata je vidljivo da pri nižim koncentracijama galna kiselina pokazuje znatno bolji učinak u odnosu na siringičnu, što se može objasniti slobodnim trima hidroksilnim skupinama koje mogu donirati vodik, dok su kod siringične kiseline OH skupine na položajima 3 i 5 zamijenjene metoksi skupinama. Vanilinska i izovanilinska kiselina imaju sličan učinak pri koncentracijama od 1,56 $\mu\text{g/mL}$ do 12,5 $\mu\text{g/mL}$, dok pri višim koncentracijama izovanilinska kiselina pokazuje bolju sposobnost hvatanja DPPH radikala. Obje kiseline djeluju znatno slabije od galne i siringične. Salicilna i *p*-hidroksibenzojeva kiselina nisu pokazale antiradikalnu aktivnost pri ispitivanim koncentracijama.

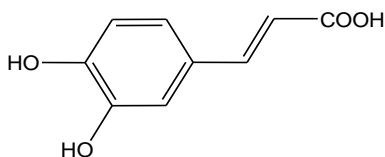
Navedene razlike u antiradikalnom djelovanju mogu se povezati sa strukturnim karakteristikama ispitanih hidroksibenzojevih kiselina, tj. s vrstom, brojem i međusobnim položajem supstituenata vezanih na benzenski prsten. Najbolju sposobnost hvatanja DPPH radikala pokazala je galna kiselina (Slika 30) koja ima tri OH skupine u međusobnom *orto* položaju. Učinak siringične, s jednom slobodnom i dvije metilirane OH skupine, je slabiji u usporedbi s galnom kiselinom. Vanilinska i izovanilinska kiselina posjeduju jednu slobodnu i jednu metiliranu OH skupinu, što je očito razlog njihove slabije aktivnosti, dok *p*-

hidroksibenzojeva i salicilna kiselina sa samo jednom OH skupinom u svojoj strukturi nemaju antiradikalna svojstva pri ispitivanim koncentracijama.



Slika 30. Galna kiselina - hidroksibenzojeva kiselina s najboljim antiradikalnim djelovanjem

Tablica 23 prikazuje sposobnost hvatanja DPPH radikala istraživanih hidroksicimetnih kiselina. U odnosu na sve ispitane kiseline, antiradikalnim svojstvima istaknula se kavena kiselina (Slika 31) koja je pokazala najjače djelovanje pri svim testiranim koncentracijama. Sličan učinak zabilježen je za ružmarinsku i klorogensku kiselinu pri koncentracijama višim od 1,56 $\mu\text{g/mL}$ i 3,13 $\mu\text{g/mL}$, dok je pri nižim koncentracijama ružmarinska kiselina bila učinkovitija. Sinapinska kiselina također je pokazala snažno antiradikalno djelovanje neutralizirajući više od 90% radikala pri koncentracijama višim od 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Iako su strukturno vrlo slične, ferulična i izoferulična kiselina pokazale su znatnu razliku u djelovanju. Pri višim testiranim koncentracijama ferulična kiselina imala je dobar učinak, a pri nižim je značajno zaostajala za predhodno navedenim kiselinama, dok izoferulična kiselina nije niti pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji postigla 50%-tnu inhibiciju DPPH radikala. Najslabiji učinak zabilježen je za *p*-kumarinsku kiselinu koja također nije ostvarila 50%-tnu inhibiciju DPPH radikala, kao i za *o*-kumarinsku kiselinu koja nije bila djelotvorna u testiranim koncentracijama. Kao i u slučaju derivata hidroksibenzojeve kiseline, navedene razlike u antiradikalnoj aktivnosti mogu se povezati sa strukturnim obilježjima ispitanih hidroksicimetnih kiselina. Kavena, klorogenska i ružmarinska kiselina s najboljom sposobnošću hvatanja slobodnog DPPH radikala imaju dvije hidroksilne skupine u *orto* položaju, dok je u strukturi ferulične i sinapinske kiseline samo jedna hidroksilna skupina slobodna.



Slika 31. Kavena kiselina - hidroksicimetna kiselina s najboljim antiradikalnim djelovanjem

Prisutnost jedne metilirane hidroksilne skupine u strukturi ferulične kiseline te dvije kod sinapinske kiseline može biti razlogom slabije djelotvornosti. Izoferulična kiselina značajno je slabiji hvatač slobodnih radikala od ferulične kiseline, dok *p*- i *o*-kumarinska kiselina sa samo jednom hidroksilnom skupinom na benzenskom prstenu najslabije djeluju ili ne pokazuju učinak.

U Tablici 24. usporedno su prikazane EC₅₀ vrijednosti hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina. Uzimajući u obzir njihova strukturna obilježja može se utvrditi kako monohidroksidni derivati hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina najslabije hvataju DPPH radikale. Jedino *p*-kumarinska kiselina pri koncentraciji od 100 µg/mL neutralizira 46,79±0,83% slobodnih radikala, dok ostale kiseline s jednom hidroksilnom skupinom ne pokazuju učinak pri testiranim koncentracijama. Navedena opažanja u skladu su s prethodnim istraživanjima ovih fenolnih kiselina. Rice-Evans i suradnici (1996) došli do zaključka kako monohidroksibenzojeve kiseline s OH skupinom u *orto* (salicilna kiselina) i *para* (*p*-hidroksibenzojeva kiselina) položaju ne pokazuju antiradikalnu aktivnost prema radikalima generiranim u vodenoj fazi, vjerojatno zbog elektron-akceptorskih svojstava karboksilne skupine na fenolnom prstenu koja utječe na hidroksilne skupine u *o*- i *p*-položaju, dok *meta*-supstituirani derivati pokazuju antiradikalni učinak. Naši rezultati pokazali su da monohidroksicimetne kiseline ipak pokazuju bolji učinak od monohidroksibenzojevih kiselina te da je za djelovanje monohidroksicimetnih kiselina povoljniji *para* položaj hidroksilne skupine u odnosu na *orto* položaj. Do ovakvog učinka vjerojatno dolazi zbog činjenice da etilenska skupina između fenolnog prstena i karboksilne skupine povoljno utječe na reducirajuća svojstva OH skupine, pogotovo ako se ona nalazi u *p*-položaju. Galna (trihidroksibenzojeva) i kavena (dihidroksicimetna) kiselina pokazuju snažan učinak, značajno bolji od pripadajućih monohidroksi derivata, što je u skladu s literaturnim podacima (Rice-Evans i sur., 1996). Naime, općenito svi polifenoli djeluju bolje od monofenola, a uvođenje druge OH skupine u *o*- ili *p*-položaj povećava antioksidacijsku aktivnost. Galna i kavena kiselina ostvaruju slične EC₅₀ vrijednosti. Iako kavena kiselina pripada hidroksicimetnim derivatima za koje očekujemo da će bolje djelovati od hidroksibenzojevih, galna kiselina posjedovanjem tri fenolne skupine nadoknađuje negativni učinak karboksilne skupine vezane direktno na aromatsku jezgru. Očekivano, ferulična kiselina bolje djeluje od vanilinske, obzirom da postrani lanac -CH=CH-COOH povoljno djeluje na otpuštanje vodika iz hidroksilne skupine u *para* položaju. Naši rezultati potvrđuju i činjenicu da metoksi skupina u položaju C-3, zbog svojih elektron-donorskih svojstava, povećava stabilnost ariloksi radikala koji nastaje nakon otpuštanja vodika s 4-OH skupine. Ta

metoksi skupina delokalizira elektrone, što rezultira boljim djelovanjem ferulične kiseline od *p*-kumarinske. Izoferulična kiselina, vjerojatno zbog obrnutog poretka supstituenata, pokazuje znatno slabiji učinak od ferulične. Izovanilinska i izoferulična kiselina pokazuju sličan učinak, međutim, nešto bolji učinak izovanilinske kiseline može se pripisati hidroksilnoj skupini u *meta* položaju koji je zaštićen od nepovoljnog utjecaja karboksilne skupine. Zbog istog razloga izovanilinska kiselina pokazuje bolji učinak od vanilinske kiseline.

Siringična kiselina očekivano ima slabiji učinak od galne kiseline obzirom da su hidroksilne skupine u položajima 3 i 5 zamijenjene metoksi skupinama. Poznat je podatak kako *orto* supstitucija s elektron-donorskom alkilnom ili metoksi skupinom povećava stabilnost ariloksidiradikala, pa stoga možemo očekivati da djeluje bolje od vanilinske i *p*-hidroksibenzojeve, što je i potvrđeno našim rezultatima. Treba napomenuti da metoksi supstitucija kod fenolnih kiselina manje doprinosi povećanju antioksidacijske sposobnosti od uvođenja OH skupine (Cuvelier i sur., 1992.). Ista opažanja potvrdili smo i za hidroksicimetne kiseline, pa se tako antiradikalno djelovanje kiselina može opisati nizom sinapinska > ferulična > *p*-kumarinska. S očekivanim djelovanjem u provedenim ispitivanjima jedino se ne podudara djelovanje siringične i sinapinske kiseline, obzirom da bi zbog pozitivnog utjecaja postranog lanca $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ bilo za očekivati da sinapinska kiselina djeluje bolje od siringične, a iz Tablica 22-24 vidljivo je da siringična kiselina pokazuje bolja antiradikalna svojstva. Klorogenska i ružmarinska kiselina, kao zasebne strukturne varijante, esteri su kavene kiseline. Prema literaturnim podacima klorogenska kiselina trebala bi djelovati slabije a ružmarinska jače od kavene kiseline, međutim, antiradikalna aktivnost dobivena ovim mjerenjima slijedi niz: kavena > ružmarinska > klorogenska. Tablica 25 donosi prikaz statističke analize EC_{50} vrijednosti za antiradikalnu aktivnost fenolnih kiselina.

Tablica 22. Antiradikalna sposobnost hidroksibenzojevih kiselina. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

		Sposobnost hvatanja DPPH' (%)									
uzorak	konc. ($\mu\text{g/mL}$)	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19
Galna		99,60 \pm 0,01	99,01 \pm 0,26	98,61 \pm 0,30	97,43 \pm 0,23	95,65 \pm 0,64	95,25 \pm 0,64	94,07 \pm 0,10	92,69 \pm 0,41	69,56 \pm 3,33	34,97 \pm 5,90
Siringična		94,77 \pm 0,18	94,57 \pm 0,46	94,20 \pm 0,47	93,27 \pm 0,24	91,03 \pm 0,32	85,98 \pm 0,76	68,95 \pm 2,15	48,39 \pm 2,87	27,09 \pm 3,10	13,45 \pm 3,12
Izovanilinska		56,56 \pm 0,97	39,15 \pm 1,62	28,75 \pm 1,50	19,97 \pm 5,35	12,18 \pm 3,77	11,63 \pm 4,04	4,90 \pm 4,49	0,76 \pm 2,30	0,17 \pm 5,13	2,20 \pm 2,76
Vanilinska		34,41 \pm 1,77	24,40 \pm 2,63	20,54 \pm 0,60	21,78 \pm 2,56	14,88 \pm 6,39	11,79 \pm 2,58	4,63 \pm 2,48	4,23 \pm 3,57	-3,87 \pm 2,88	1,76 \pm 3,98
*Salicilna		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
* <i>p</i> -Hidroksibenzojeva		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* - navedene kiseline nisu pokazale djelovanje pri ispitivanim koncentracijama

Tablica 23. Antiradikalna sposobnost hidroksicimetnih kiselina. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

		Sposobnost hvatanja DPPH* (%)									
uzorak	konc. ($\mu\text{g/mL}$)	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19
Kavena		97,34 \pm 0,31	96,72 \pm 0,03	95,49 \pm 0,04	95,29 \pm 0,83	95,49 \pm 0,62	94,67 \pm 1,20	93,65 \pm 1,50	82,59 \pm 0,14	54,97 \pm 5,40	22,41 \pm 5,41
Klorogenska		95,59 \pm 0,01	95,40 \pm 0,77	95,40 \pm 0,27	94,67 \pm 0,25	93,01 \pm 0,02	84,56 \pm 6,20	49,60 \pm 1,43	27,71 \pm 1,11	13,18 \pm 1,27	2,15 \pm 5,99
Ferulična		95,36 \pm 0,35	93,69 \pm 0,11	83,11 \pm 0,05	80,30 \pm 4,04	67,90 \pm 0,33	46,90 \pm 4,12	31,15 \pm 2,58	22,22 \pm 4,84	11,40 \pm 3,37	0,10 \pm 11,02
Ružmarinska		95,26 \pm 1,30	95,37 \pm 0,05	95,20 \pm 0,71	95,55 \pm 0,30	94,84 \pm 0,30	91,46 \pm 0,42	76,49 \pm 4,77	39,48 \pm 3,63	21,53 \pm 1,04	21,53 \pm 1,04
Sinapinska		94,40 \pm 0,05	94,21 \pm 0,32	93,28 \pm 0,99	92,53 \pm 0,07	88,05 \pm 0,94	60,77 \pm 4,60	36,15 \pm 1,67	20,46 \pm 1,83	11,49 \pm 4,55	7,24 \pm 3,60
<i>p</i> -Kumarinska		46,79 \pm 0,83	18,25 \pm 4,86	11,23 \pm 0,45	6,69 \pm 3,40	9,18 \pm 0,11	1,97 \pm 3,17	2,17 \pm 2,88	2,41 \pm 2,06	-0,27 \pm 1,16	-1,29 \pm 1,43
Izoferulična		41,04 \pm 6,77	23,21 \pm 4,54	22,82 \pm 2,22	17,52 \pm 0,57	13,14 \pm 5,62	7,06 \pm 1,21	4,98 \pm 1,15	1,31 \pm 1,09	-0,75 \pm 0,11	-2,57 \pm 3,04
* <i>o</i> -Kumarinska		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* navedene kiseline nisu pokazale djelovanje pri ispitivanim koncentracijama

Tablica 24. Usporedni prikaz EC₅₀ vrijednosti za antiradikalnu aktivnost hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina

Hidroksibenzojeve kiseline	EC ₅₀ (µg/mL)		Hidroksicimetne kiseline
salicilna	*	*	<i>o</i> -kumarinska
<i>p</i> -hidroksibenzojeva	*	>100	<i>p</i> -kumarinska
galna	0,24±0,03	0,36±0,03	kavena
vanilinska	>100	3,56±0,36	ferulična
izovanilinska	79,33±2,22	>100	izoferulična
siringična	0,85±0,07	2,37±0,48	sinapinska
		1,69±0,02	klorogenska
		1,01±0,07	ružmarinska

* navedene kiseline nisu pokazale djelovanje pri ispitivanim koncentracijama

Tablica 25. Statistička analiza EC₅₀ vrijednosti za antiradikalnu aktivnost hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina

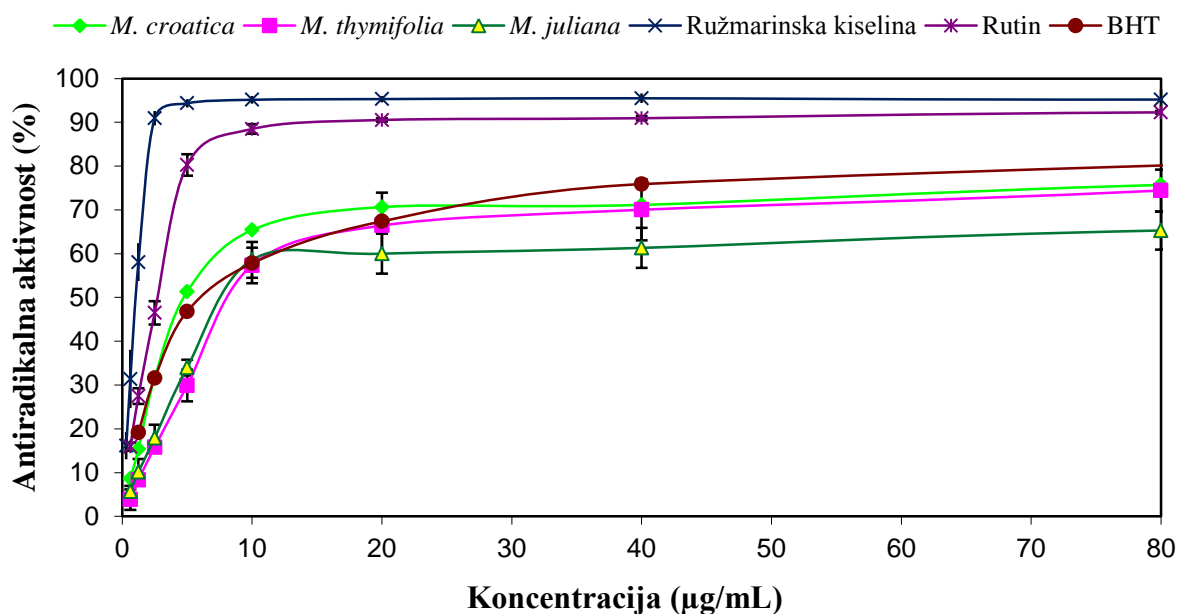
	GAL	IZOVAN	SIRIN	KAV	FER	SINAP	KLO	RUŽ
GAL	/	p<0,001	p=0,841	p=0,849	p=0,003	p=0,085	p=0,434	p=0,910
IZOVAN		/	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
SIRIN			/	p=0,849	p=0,015	p=0,391	p=0,894	p=0,946
KAV				/	p=0,004	p=0,115	p=0,498	p=0,874
FER					/	p=0,610	p=0,164	p=0,024
SINAP						/	p=0,899	p=0,497
KLO							/	p=0,931
RUŽ								/

p<0,05 smatra se statistički značajnom razlikom

GAL – galna kiselina; IZOVAN – izovanilinska kiselina; SIRIN – siringična kiselina; KAV – kavena kiselina; FER – ferulična kiselina; SINAP – sinapinska kiselina; KLO – klorogenska kiselina; RUŽ – ružmarinska kiselina

Ispitano je antiradikalno djelovanje biljnih ekstrakata bogatih sadržajem hidroksicimetnih kiselina u usporedbi s glavnim bioaktivnim sastavnicama i referentnim antioksidansom butil hidroksitoluenom (BHT). Slika 32 pokazuje postotak inhibicije DPPH slobodnog radikala za ispitane etanolne ekstrakte vrsta roda *Micromeria* u opadajućem koncentracijskom nizu od 640 µg/mL do 0,63 µg/mL. Aktivnosti ekstrakata iznosile su 16-30%, 30-52% i 57-62% pri koncentracijama 2,5 µg/mL, 5 µg/mL i 10 µg/mL. U odnosu na ekstrakte, ružmarinska kiselina i rutin pokazali su snažniju antiradikalnu učinkovitost. Među

ispitanim ekstraktima isticala se vrsta *M. croatica* pokazujući najbolji učinak. Ostvarena je EC_{50} vrijednost od 4,67 $\mu\text{g/mL}$, što je značajno bolje u odnosu na BHT čija je EC_{50} vrijednost iznosila 6,45 $\mu\text{g/mL}$ (Tablica 35). Rezultati provedenog ispitivanja ukazali su na snažan antiradikalni potencijal vrste *M. croatica* koji se može pripisati visokim udjelima hidroksicimetnih derivata (poglavlje 4.1.2).



Slika 32. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala ekstrakata vrsta *M. croatica*, *M. juliana*, *M. thymifolia*, ružmarinske kiseline, rutina i referentnog antioksidansa (BHT). Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

4.3.1.2 Ukupni antioksidacijski kapacitet

Ispitan je ukupni antioksidacijski kapacitet hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina te etanolnih ekstrakta vrsta roda *Micromeria* primjenom fosfomolibdenske metode koja se temelji na redukciji Mo(VI) u Mo(V) pomoću antioksidacijske komponente i nastajanju zelenog fosfat-Mo(V) kompleksa s maksimumom apsorbancije na 695 nm. Kompleks se formira pri kiselom pH i to već na sobnoj temperaturi. No, reakcija pokazuje pozitivnu ovisnost o temperaturi i stoga se postiže značajno veći učinak pri višim temperaturama. Nastali kompleks je nekoliko dana stabilan na sobnoj temperaturi. Formiranje kompleksa također ovisi o koncentraciji antioksidansa. Pri višim koncentracijama antioksidansa formira se veća količina kompleksa i ispitivana otopina pokazuje izrazitiju zelenu boju. Smanjenjem koncentracije antioksidansa ispitivana otopina postaje slabije zelena, dok je u nedostatku antioksidansa otopina bezbojna budući da ne dolazi do formiranja kompleksa. Prieto i suradnici (1999.) uveli su fosfomolibdensku metodu kao jednostavnu metodu za evaluaciju hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa. Danas se metoda koristi u probiru uzoraka različitog porijekla i sastava, odnosno kemijskih struktura. U Tablici 26 prikazani su rezultati ispitivanja ukupnog antioksidacijskog kapaciteta hidroksibenzojevih kiselina. U tu svrhu pripremljeni su nizovi razrjeđenja od 200 µg/mL do 12,5 µg/mL. Iz izmjerenih apsorbancija na 695 nm izračunan je ukupni antioksidacijski kapacitet izražen kao ekvivalent vitamina C (askorbinska kiselina).

U Tablici 26 šest hidroksibenzojevih kiselina poredano je prema intenzitetu ukupnog antioksidacijskog djelovanja. Galna kiselina pokazala je najveći ukupni antioksidacijski kapacitet. Znatno manji antioksidacijski kapacitet imale su siringična i izovanilinska kiselina koje su prema jačini djelovanja bile gotovo ujednačene. Pri ispitanim koncentracijama, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska i salicilna kiselina nisu pokazale učinak. Vidljivo je da ukupni antioksidacijski kapacitet siringične i izovanilinske kiseline znatno zaostaje za ukupnim antioksidacijskim kapacitetom galne kiseline. Provedenim ispitivanjem ponovo su istaknuta antioksidacijska svojstva galne kiseline koja je prethodno pokazala i najbolju sposobnost hvatanja slobodnog DPPH radikala u odnosu na ostale hidroksibenzojeve kiseline.

Tablica 26. Ukupni antioksidacijski kapaciteti hidroksibenzojevih kiselina. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

		Vitamin C ekvivalent ($\mu\text{g/mL}$)				
uzorak	konc. ($\mu\text{g/mL}$)	200	100	50	25	12,5
Galna		54,49 \pm 2,41	37,90 \pm 2,98	33,84 \pm 2,90	24,14 \pm 1,46	18,84 \pm 0,52
Siringična		6,72 \pm 0,92	4,70 \pm 0,58	2,02 \pm 0,35	1,37 \pm 0,05	0,99 \pm 0,01
Izovanilinska		6,72 \pm 0,01	3,49 \pm 0,24	1,94 \pm 0,66	1,17 \pm 0,45	-0,12 \pm 0,25
* <i>p</i> -Hidroksibenzojeva		*	*	*	*	*
*Vanilinska		*	*	*	*	*
* Salicilna		*	*	*	*	*

* navedene kiseline nisu pokazale djelovanje pri ispitivanim koncentracijama

Tablica 27 donosi rezultate ispitivanja ukupnog antioksidacijskog kapaciteta hidroksicimetnih kiselina. Osam hidroksicimetnih kiselina poredano je prema intenzitetu ukupnog antioksidacijskog djelovanja. Kavena i sinapinska kiselina pokazale su najsnažniji antioksidacijski učinak pri svim testiranim koncentracijama. Nešto slabije djelovanje utvrđeno je za ružmarinsku i feruličnu kiselinu pri koncentracijama manjim od 50 $\mu\text{g/mL}$. Izoferulična kiselina je već pri koncentracijama manjim od 100 $\mu\text{g/mL}$ pokazala značajno smanjenje antioksidacijskog djelovanja u odnosu na najveću testiranu koncentraciju. Još izraženiji pad aktivnosti sniženjem koncentracije zabilježen je za klorogensku i *p*-kumarinsku kiselinu, dok *o*-kumarinska kiselina nije bila djelotvorna u ispitivanim koncentracijama. Prema dobivenim rezultatima za ukupni antioksidacijski kapacitet može se istaknuti učinak kavene, sinapinske i ružmarinske koje su prethodno također pokazale i snažnu sposobnost hvatanja slobodnog DPPH radikala.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da pri najvećoj testiranoj koncentraciji sve hidroksicimetne kiseline (osim *o*-kumarinske) pokazuju učinak ekvivalentan vitaminu C u koncentraciji 58,00-62,52 $\mu\text{g/mL}$. Pri dvostruko manjoj koncentraciji (100 $\mu\text{g/mL}$) antioksidacijski kapacitet izoferulične, klorogenske i *p*-kumarinske značajno opada i nastavlja

trend smanjenja učinka svakim novim smanjenjem koncentracije. Ukupni antioksidacijski kapacitet ružmarinske i ferulične kiseline proporcionalno se smanjuje počevši od koncentracije 50 µg/mL. Pri koncentraciji 50 µg/mL jedino kavena i sinapinska kiselina zadržavaju djelovanje ekvivalentno 60 µg/mL vitamina C, a njihov učinak se počinje smanjivati tek pri koncentracijama 25 µg/mL i 12,5 µg/mL. Tablice 28 i 29 donose usporedni prikaz ukupnog antioksidacijskog kapaciteta hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina izražen kao miligrami ekvivalenta askorbinske kiseline po gramu fenolne kiseline te statističku analizu ovih vrijednosti.

Tablica 27. Ukupni antioksidacijski kapacitet hidroksicimetnih kiselina. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

		Vitamin C ekvivalent (µg/mL)				
uzorak	konc. (µg/mL)	200	100	50	25	12,5
Kavena		62,52 \pm 0,04	62,37 \pm 0,17	61,49 \pm 0,54	41,27 \pm 5,30	20,26 \pm 0,56
Sinapinska		62,45 \pm 0,03	62,49 \pm 0,10	60,98 \pm 0,42	37,44 \pm 0,90	21,14 \pm 2,36
Ružmarinska		62,29 \pm 0,09	60,88 \pm 0,34	50,05 \pm 0,14	34,56 \pm 2,24	17,58 \pm 0,47
Ferulična		61,98 \pm 0,02	61,82 \pm 0,00	43,62 \pm 2,95	26,68 \pm 0,20	13,17 \pm 0,79
Izoferulična		61,71 \pm 0,03	46,72 \pm 4,30	23,97 \pm 3,85	10,45 \pm 0,75	6,86 \pm 0,53
Klorogenska		58,56 \pm 0,58	39,50 \pm 1,94	21,80 \pm 0,49	12,86 \pm 1,32	8,40 \pm 0,71
<i>p</i>-Kumarinska		58,00 \pm 1,43	36,91 \pm 1,83	19,81 \pm 1,34	11,50 \pm 0,98	4,73 \pm 0,30

* navedene kiseline nisu pokazale djelovanje pri ispitivanim koncentracijama

Tablica 28. Usporedni prikaz ukupnog antioksidacijskog kapaciteta hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina izražen kao miligrami ekvivalenta askorbinske kiseline po gramu fenolne kiseline

Hidroksibenzojeve kiseline	Ukupni antioksidacijski kapacitet mg EAK/g		Hidroksicimetne kiseline
salicilna	*	*	<i>o</i> -kumarinska
<i>p</i> -hidroksibenzojeva	*	369,12±18,34	<i>p</i> -kumarinska
galna	379,01±29,82	623,71±1,71	kavena
vanilinska	*	618,22±0,00	ferulična
izovanilinska	34,93±2,48	467,23±43,10	izoferulična
siringična	47,07±5,82	624,95±1,07	sinapinska
		395,03±19,34	klorogenska
		608,81±3,41	ružmarinska

Rezultati su izračunati iz uzorka koncentracije 100 µg/mL

* navedene kiseline nisu pokazale djelovanje pri ispitivanim koncentracijama

Tablica 29. Statistička analiza vrijednosti ukupnog antioksidacijskog kapaciteta hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina izraženih kao miligrami ekvivalenta askorbinske kiseline po gramu fenolne kiseline

	GAL	SIRIN	IZOVAN	KAV	SINAP	RUŽ	FER	IZOFER	KLO	<i>p</i> -KUM
GAL	/	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,947	p=0,949
SIRIN		/	p=0,968	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
IZOVAN			/	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
KAV				/	p=0,938	p=0,946	p=0,960	p<0,001	p<0,001	p<0,001
SINAP					/	p=0,962	p=0,983	p<0,001	p<0,001	p<0,001
RUŽ						/	p=0,962	p<0,001	p<0,001	p<0,001
FER							/	p<0,001	p<0,001	p<0,001
IZOFER								/	p=0,001	p<0,001
KLO									/	p=0,673
<i>p</i> -KUM										/

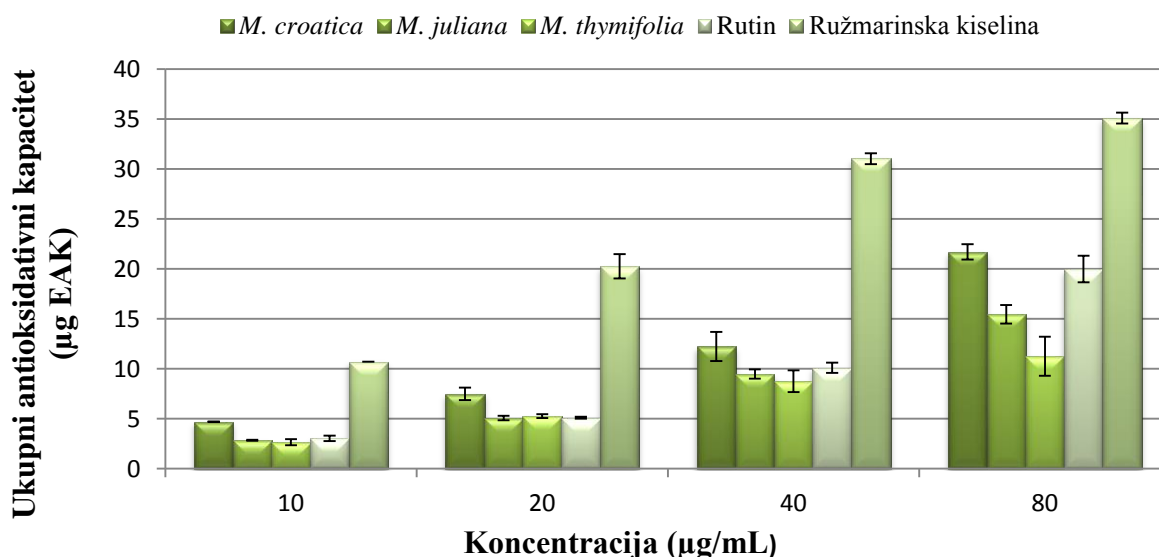
p<0,05 smatra se statistički značajnom razlikom

ns – nema signifikantne razlike

GAL – galna kiselina; SIRIN – siringična kiselina; IZOVAN – izovanilinska kiselina; KAV – kavena kiselina; SINAP – sinapinska kiselina; RUŽ – ružmarinska kiselina; FER – ferulična kiselina; IZOFER – izoferulična kiselina; KLO – klorogenska kiselina; *p*-KUM – *p*-kumarinska kiselina

Na Slici 33 i Tablici 35 prikazani su rezultati određivanja ukupnog antioksidacijskog kapaciteta etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria*, izraženi kao ekvivalent askorbinske kiseline (vitamin C). Vrsta *M. croatica* imala je najbolji učinak, a slijede je *M. juliana* i *M. thymifolia*. Svi su ispitani biljni uzorci pokazali aktivnost u ovisnosti o dozi, a njihova se

učinkovitost smanjivala sljedećim redom: ružmarinska kiselina > *M. croatica* > rutin > *M. juliana* > *M. thymifolia*. Vrsta *M. croatica* pokazala je najveći antioksidacijski kapacitet s izračunatom vrijednosti od 470,03 miligram ekvivalenata askorbinske kiseline po gramu ekstrakta.



Slika 33. Ukupni antioksidacijski kapacitet etanolnih ekstrakata vrsta *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* teružmarinske kiseline i rutina. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

4.3.1.3 Sposobnost redukcije

Primijenjena spektrofotometrijska metoda određivanja redukcijske snage temelji se na sposobnosti ispitivanih supstancija da reduciraju ione željeza(III). Prisutnost reducensa u reakcijskoj smjesi s kalijevim heksacijanoferatom uzrokuje redukciju Fe^{3+} u Fe^{2+} oblik koji dodatkom soli trovalentnog željeza daje plavu otopinu (Berlinsko modrilo). Intenzitet obojenja može se pratiti na 700 nm, a veće vrijednosti apsorbancije upućuju na veću redukcijsku moć ispitivane supstancije. Koncentracija pri kojoj se postiže apsorbancija od 0,5 uzima se kao EC_{50} . U ovom radu određena je sposobnost redukcije hidroksibenzojevim i hidroksicimetnim kiselinama te etanolnim ekstraktima vrsta roda *Micromeria*, a rezultati su prikazani u Tablicama 30, 31, 32, 33 i na Slici 34.

Za određivanje redukcijske snage fenolnih kiselina pripremljeni su koncentracijski nizovi u rasponu od 100 µg/mL do 0,19 µg/mL. U Tablici 30 prikazani su rezultati ispitivanja hidroksibenzojevih kiselina. Najviše vrijednosti apsorbancija pri svim testiranim

koncentracijama izmjerene su za galnu kiselinu. Značajne vrijednosti apsorbancija izmjerene su pri koncentracijama galne kiseline iznad 0,39 $\mu\text{g/mL}$, uz EC_{50} vrijednost 1,25 $\mu\text{g/mL}$, što ukazuje na vrlo izraženu redukcijsku sposobnost. Iako djeluje slabije, siringična kiselina je pokazala također izraženu sposobnost redukcije ($\text{EC}_{50} = 4,52 \mu\text{g/mL}$). Za vanilinsku i izovanilinsku kiselinu zabilježena su znatno slabija redukcijska svojstva u odnosu na galnu i siringičnu, uz EC_{50} vrijednosti 50,34 $\mu\text{g/mL}$ i 90,87 $\mu\text{g/mL}$. Salicilna i *p*-hidroksibenzojeva kiselina nisu reducirale ione željeza(III) pri ispitivanim koncentracijama.

Tablica 31 donosi rezultate određivanje redukcijske snage hidroksicimetnih kiselina. Vidljivo je da su najviše vrijednosti apsorbancije izmjerene za ružmarinsku i kavenu koje su pokazale snažan učinak već u koncentracijama iznad 0,78 $\mu\text{g/mL}$. EC_{50} vrijednosti iznosile su 1,97 $\mu\text{g/mL}$ i 2,22 $\mu\text{g/mL}$. Nešto slabiji, ali još uvijek snažan učinak, pokazala je klorogenska kiselina s EC_{50} vrijednosti od 3,96 $\mu\text{g/mL}$. Iz rezultata je vidljivo da povećanjem koncentracije klorogenska kiselina zaostaje za ružmarinskom i kavenom kiselinom koje najviše vrijednosti apsorbancije postižu već u koncentracijama od 50 $\mu\text{g/mL}$, dok navedeni učinak klorogenska kiselina dostiže tek pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$. Sinapinska i ferulična kiselina također su pokazale dobar učinak s EC_{50} vrijednostima 5,59 $\mu\text{g/mL}$ odnosno 7,92 $\mu\text{g/mL}$. Izoferulična kiselina pokazala je slabu sposobnost redukcije, dok je redukcijska snaga *o*- i *p*-kumarinske kiseline bila najniža budući da ove kiseline niti u najvišoj testiranoj koncentraciji nisu ostvarile 50%-tni učinak.

Tablica 30. Redukcijska sposobnost hidroksibenzojevih kiselina. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

		Sposobnost redukcije iona željeza (III) (Apsorbancija)									
uzorak	konc. ($\mu\text{g/mL}$)	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19
Galna		4,23 \pm 00	4,24 \pm 001	4,23 \pm 0,01	4,12 \pm 0,15	1,48 \pm 0,27	1,07 \pm 0,00	0,57 \pm 0,09	0,39 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02
Siringična		4,12 \pm 0,05	2,65 \pm 0,01	1,54 \pm 0,03	0,10 \pm 0,03	0,66 \pm 0,02	0,37 \pm 0,03	0,22 \pm 0,02	0,14 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01
Izovanilinska		0,80 \pm 0,01	0,53 \pm 0,00	0,35 \pm 0,01	0,24 \pm 0,00	0,16 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,08 \pm 0,01	0,07 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00
Vanilinska		0,53 \pm 0,00	0,35 \pm 0,00	0,24 \pm 0,01	0,17 \pm 0,00	0,13 \pm 0,00	0,11 \pm 0,01	0,09 \pm 0,00	0,08 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00
*Salicilna		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
* <i>p</i> -Hidroksibenzojeva		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* navedene kiseline nisu pokazale djelovanje pri ispitivanim koncentracijama

Tablica 31. Redukcijska sposobnost hidroksicimetnih kiselina. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

		Sposobnost redukcije iona željeza(III) (Apsorbancija)									
uzorak	konc. ($\mu\text{g/mL}$)	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19
Ružmarinska		4,17 \pm 0,04	4,17 \pm 0,03	3,75 \pm 0,48	1,73 \pm 0,22	10,18 \pm 0,07	0,72 \pm 0,02	0,43 \pm 0,01	0,27 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01	0,12 \pm 0,00
Kavena		4,27 \pm 0,01	4,23 \pm 0,00	3,15 \pm 0,01	1,83 \pm 0,05	1,14 \pm 0,00	0,67 \pm 0,01	0,40 \pm 0,01	0,25 \pm 0,02	0,18 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01
Klorogenska		4,20 \pm 0,03	3,03 \pm 0,04	1,81 \pm 0,05	1,18 \pm 0,08	0,66 \pm 0,05	0,43 \pm 0,02	0,32 \pm 0,03	0,22 \pm 0,03	0,18 \pm 0,01	0,16 \pm 0,00
Sinapinska		4,12 \pm 0,01	2,04 \pm 0,08	1,59 \pm 0,01	0,99 \pm 0,01	0,58 \pm 0,02	0,32 \pm 0,01	0,20 \pm 0,00	0,15 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02
Ferulična		3,95 \pm 0,05	1,79 \pm 0,04	1,24 \pm 0,00	0,73 \pm 0,00	0,43 \pm 0,01	0,25 \pm 0,00	0,16 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00
Izoferulična		0,74 \pm 0,03	0,50 \pm 0,00	0,34 \pm 0,02	0,23 \pm 0,00	0,15 \pm 0,00	0,11 \pm 0,00	0,08 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,04 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00
*o-Kumarinska		0,21 \pm 0,00	0,15 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00	0,08 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01
*p-Kumarinska		0,12 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,07 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00

Rezultati ispitivanja koje su proveli Sevgi i suradnici (2015) također su ukazali na redukcijsku sposobnost za kavene, klorogenske, ferulične, galne, *p*-hidroksibenzojeve, ružmarinske, siringične i vanilinske kiseline, čije su EC_{50} vrijednosti iznosile oko 100 $\mu\text{g/mL}$. Spomenuti rezultati nisu sukladni rezultatima dobivenim u doktorskom radu, vjerovatno zbog izmjena u metodi kojom su rađena mjerenja. Kiliç i Yeşiloğlu (2013) zaključili su da *p*-kumarinska kiselina pri koncentracijama od 10 do 20 $\mu\text{g/mL}$ posjeduje snažnu moć redukcije, ali nisu dali podatak za EC_{50} vrijednost. Nadalje, u svojim ispitivanjima Wang i suradnici (2011) izračunali su da EC_{50} vrijednost izoferulične kiseline za sposobnost reduciranja iznosi 8,84 $\mu\text{g/mL}$.

Usporedbom strukturnih obilježja i određenih EC_{50} vrijednosti hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih derivata možemo doći do nekoliko zaključaka. Galna kiselina ima nešto bolji učinak od kavene kiseline jer posjeduje jednu OH skupinu više. Vanilinska kiselina ($EC_{50}=50,34\mu\text{g/mL}$) znatno zaostaje za feruličnom kiselinom ($EC_{50}=7,92\mu\text{g/mL}$), što govori u prilog pozitivnog utjecaja bočnog nezasićenog lanca. Izo-strukture ispitanih kiselina slijede isti obrazac djelovanja, s tim da je izo-oblik uvijek slabijeg učinka od osnovnog, što ponovo možemo povezati s boljim antioksidacijskim svojstvima kiselina koje imaju OH skupinu u *para* položaju. Siringična kiselina im neočekivano bolji učinak od sinapinske kiseline, ali razlike u EC_{50} vrijednostima (4,52 $\mu\text{g/mL}$ i 5,59 $\mu\text{g/mL}$) nisu toliko izražene. Klorogenska kiselina pokazuje slabiji učinak od kavene, a ružmarinska jači, što je u skladu s opažanjima Cuvelier i suradnika (1992) koji su zaključili kako esterifikacija kavene s kina kiselinom smanjuje aktivnost kavene kiseline nasuprot esterifikaciji s 3,4-dihidroksifenil mliječnom kiselinom koja tu aktivnost povećava. Navedene rezultate možemo objasniti i elektrokemijskim parametrima fenolnih kiselina koje su istraživali Texeira i suradnici (2013). Koristeći elektrokemijske metode došli su do zaključka da uvođenje druge OH skupine u *orto* položaj dovodi do znatnog smanjenja redoks potencijala, pri čemu ispitivana kiselina postaje jači reducens. U Tablici 32 možemo vidjeti kako monohidroksidni derivati benzojevih i cimetnih kiselina nisu pokazali djelovanje, za razliku od kavene kiseline (3,4 dihidroksi cimetna kiselina) s dobrim reducirajućim svojstvima. Diferencijalnom pulsnom voltametrijom snimljen signal kavene kiseline ukazao je da se oksidacija kavene kiseline odvija u jednom koraku s prijenosom dva elektrona i dva protona, a nastali produkt identificiran je kao *o*-kinon. Supstitucijom hidroksline skupine s metoksi skupinom u strukturi kavene kiseline dobivamo feruličnu kiselinu. To rezultira pomicanjem redoks potencijala prema pozitivnijim

vrijednostima, što potkrepljuju i EC_{50} vrijednosti kavene (2,22 $\mu\text{g/mL}$) i ferulične kiseline (7,92 $\mu\text{g/mL}$). Uvođenje dodatne metoksi skupine u *orto* položaj (sinapinska kiselina) dovodi do smanjenja redoks potencijala u odnosu na feruličnu kiselinu. Tako se EC_{50} vrijednost smanjuje od 7,92 $\mu\text{g/mL}$ na 5,59 $\mu\text{g/mL}$ ukazujući da na bolju sposobnost redukcije sinapinske kiseline. U Tablici 32 dan je usporedni prikaz EC_{50} vrijednosti za sposobnost redukcije, dok je statistička analiza EC_{50} vrijednosti prikazana u Tablici 33.

Tablica 32. Usporedni prikaz EC_{50} vrijednosti za redukcijsku sposobnost hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina

Hidroksibenzojeve kiseline	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		Hidroksicimetne kiseline
Salicilna	*	>100	<i>o</i> -Kumarinska
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva	*	>100	<i>p</i> -Kumarinska
Galna	1,25 \pm 0,08	2,22 \pm 0,05	Kavena
Vanilinska	50,34 \pm 0,56	7,92 \pm 0,08	Ferulična
Izovanilinska	90,87 \pm 0,19	55,56 \pm 2,76	Izoferulična
Siringična	4,52 \pm 0,21	5,59 \pm 0,07	Sinapinska
		3,96 \pm 0,15	Klorogenska
		1,97 \pm 0,03	Ružmarinska

* navedene kiseline nisu pokazale djelovanje pri ispitivanim koncentracijama

Etanolnim ekstraktima vrsta roda *Micromeria* također je ispitana redukcijska snaga, a rezultati su prikazani na Slici 34 i Tablici 35. U ispitivanim koncentracijama 0,625-80 $\mu\text{g/mL}$ svi su testirani ekstrakti pokazali sposobnost redukcije iona željeza(III), a ostvareni učinak bio je u linearnoj ovisnosti o koncentraciji ekstrakta ($R^2 = 0,9785-0,9946$). Vrsta *M. croatica* pokazala je ponovo najjače djelovanje ($EC_{50} = 9,64 \mu\text{g/L}$) u usporedbi s vrstama *M. juliana* ($EC_{50} = 12,38 \mu\text{g/mL}$) i *M. thymifolia* ($EC_{50} = 17,46 \mu\text{g/mL}$). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da najveću redukcijsku snagu posjeduje ružmarinska kiselina s EC_{50} vrijednosti od 1,64 $\mu\text{g/mL}$, što još jednom upućuje na njezin značajan doprinos sposobnosti redukcije ispitanih vrsta roda *Micromeria*.

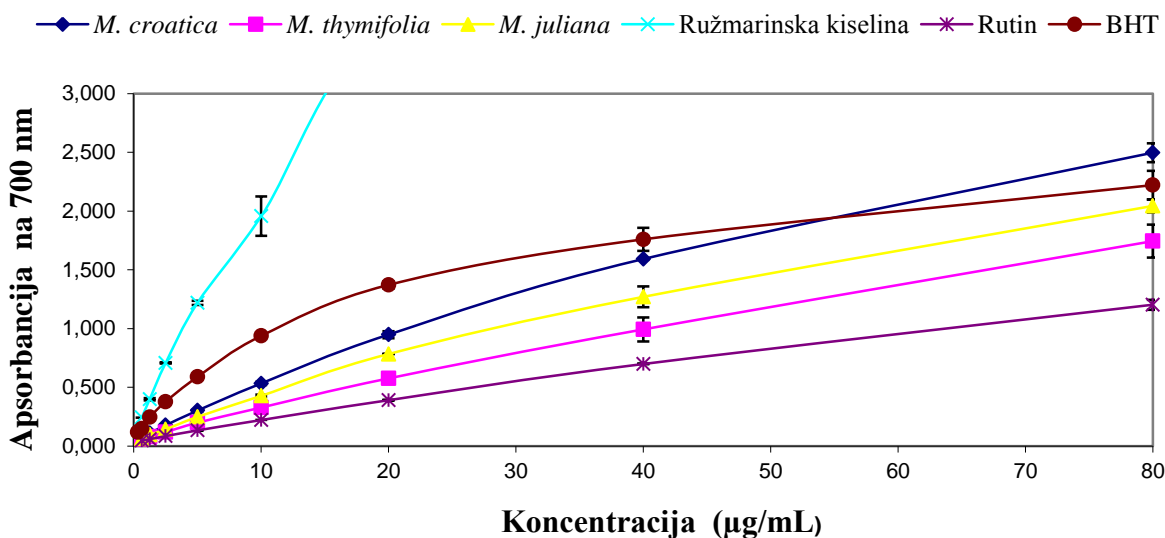
Tablica 33. Statistička analiza EC₅₀ vrijednosti za redukcijsku sposobnost hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina

	GAL	VAN	IZOVAN	SIRIN	KAV	FER	IZOFER	SINAP	KLO	RUŽ
GAL	/	p<0,001	p<0,001	p=0,003	p=0,592	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,017	p=0,709
VAN		/	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
IZOVAN			/	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
SIRIN				/	p=0,046	p=0,002	p<0,001	p=0,581	p=0,702	p=0,026
KAV					/	p<0,001	p<0,001	p=0,002	p=0,178	p=0,737
FER						/	p<0,001	p=0,046	p<0,001	p<0,001
IZOFER							/	p<0,001	p<0,001	p<0,001
SINAP								/	p=0,206	p=0,001
KLO									/	p=0,102
RUŽ										/

p<0,05smatra se statistički značajnom razlikom

ns – nema signifikantne razlike

GAL – galna kiselina; VAN – vanilinska kiselina; IZVAN – izovanilinska kiselina; SIRIN – siringična kiselina; KAV – kavena kiselina; FER – ferulična kiselina; IZOFER – izoferulična kiselina; SINAP – sinapinska kiselina; KLO – klorogenska kiselina; RUŽ – ružmarinska kiselina



Slika 34. Redukcijska sposobnost etanolnih ekstrakata vrsta *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* te ružmarinske kiseline, rutina i referentnog antioksidansa (BHT). Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

4.3.1.4 Kelirajuća aktivnost

Ispitivanje sposobnosti keliranja fenolnih kiselina temeljilo se na keliranju iona Fe^{2+} s ferozinom u kompleks koji apsorbira na 562 nm, za razliku od kompleksa Fe^{2+} s fenolnim kiselinama koji ne apsorbira pri navedenoj valnoj duljini. Stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) kao što su superoksidni radikal (O^{2-}), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikal ($\text{OH}\cdot$) katalizirano je slobodnim željezom prema Haber-Weissovoj reakciji ($\text{O}^{2-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$). Među prijelaznim metalima željezo je zbog svoje visoke reaktivnosti poznato kao najvažniji prooksidans lipidne oksidacije. Fe^{2+} ubrzava lipidnu oksidaciju pretvarajući vodikove i lipidne perokside u reaktivne slobodne radikale prema Fentonovoj reakciji – $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$ (Gülçin, 2006). Željezo sudjeluje i u daljnjem širenju oksidativnih oštećenja lipida kroz reakciju s lipidnim hidroperoksidima u kojoj nastaju reaktivni lipidni alkoksilni radikali: $\text{Fe}^{2+} + \text{LOOH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{LO}\cdot + \text{OH}\cdot$ (Štefan i sur., 2007).

U okviru ovog rada ispitana je kelirajuća aktivnost fenolnih kiselina u padajućem koncentracijskom nizu od 3200 $\mu\text{g/mL}$ do 1,56 $\mu\text{g/mL}$, a rezultati su prikazani u Tablici 34. Zanimljivo je da niti jedna hidroksicimetna kiselina nije pokazala sposobnost keliranja, dok su među hidroksibenzojevim kiselinama Fe^{2+} kelirale samo salicilna i *p*-hidroksibenzojeva kiselina koje su pokazale najslabiji učinak u prethodnim testiranjima antioksidacijskog djelovanja drugim spektrofotometrijskim metodama. Bolju sposobnost keliranja, odnosno postotak inhibicije formiranja kompleksa željeza(II) s ferozinom, pokazala je *p*-hidroksibenzojeva kiselina ($\text{EC}_{50} = 34,17 \mu\text{g/mL}$). Postotak inhibicije pri maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji od 3200 $\mu\text{g/mL}$ bio je 95,52%, dok pri koncentracijama nižim od 12,5 $\mu\text{g/mL}$ *p*-hidroksibenzojeva kiselina nije pokazala učinak. Postotak inhibicije od 71,17% određen je za salicilnu kiselinu pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji uz EC_{50} vrijednost 65,30 $\mu\text{g/mL}$. Ove dvije kiseline statistički su se značajno razlikovale u sposobnosti keliranja Fe^{2+} ($p < 0,05$).

Oko sposobnosti fenolnih kiselina da keliraju prijelazne metale, uključujući i Fe^{2+} , nalazimo najviše kontradiktornih rezultata. Tako je Gülçin (2006) pretpostavio da zbog svojih OH skupina kavena kiselina može kelirati divalentno željezo, a rezultati su pokazali kako pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ kavena kiselina kelira 53,2 % Fe^{2+} iona. Sevgi i suradnici (2015) dokazali su mogućnost keliranja za kavenu, klorogensku, feruličnu, galnu, *p*-

hidroksibenzojevu, ružmarinsku, siringičnu i vanilinsku u koncentraciji 2 mg/mL. Nasuprot tome, Andjelković i suradnici (2006) zaključili su kako fenolne kiseline bez *o*-dihidroksilne skupine nemaju sposobnost keliranja Fe^{2+} . Od ispitivanih kiselina, galna, kavena i klorogenska pokazale su sposobnost keliranja, dok vanilinska, siringična i ferulična nisu. Kiliç i Yeşiloğlu (2013) potvrdili su sposobnost keliranja za *p*-kumarinsku kiselinu koja je pri koncentraciji od 45 µg/mL kelirala 78,3% iona željeza(II).

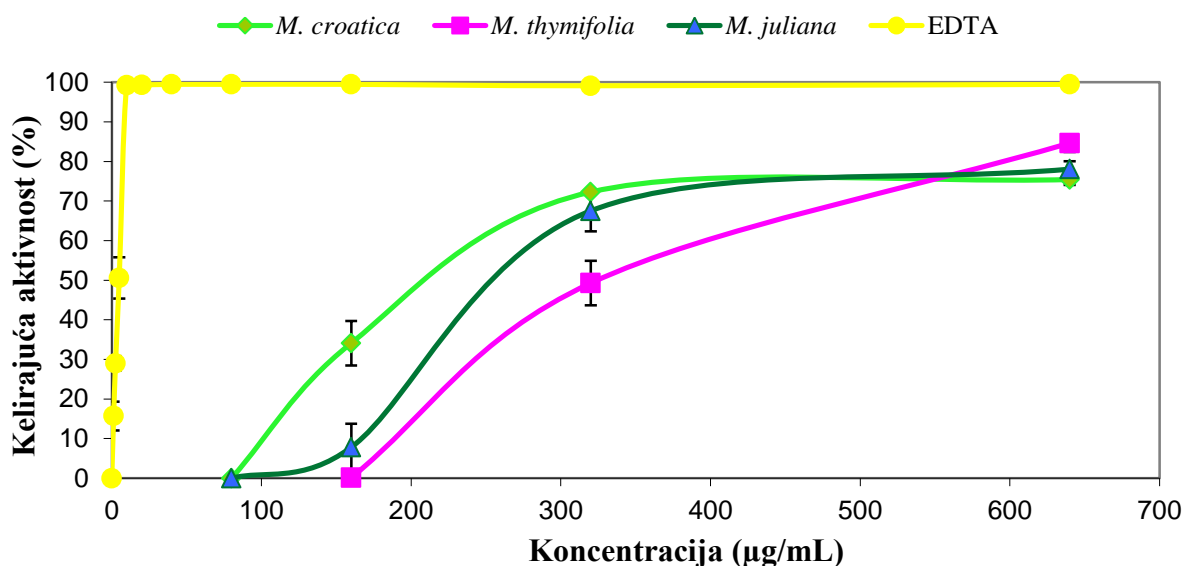
Tablica 34. Sposobnost keliranja željeza(II) *p*-hidroksibenzojeve i salicilne kiseline. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

Sposobnost keliranja iona željeza(II) (%)			
Koncentracija (µg/mL)	<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	Salicilna kiselina	EDTA
3200	95,52±0,03	71,17±0,74	99,63±0,52
1600	94,60±0,04	70,53±3,13	98,71±0,25
800	92,97±0,68	65,87±3,09	98,49±0,06
400	91,45±0,81	64,17±2,17	98,24±0,28
200	87,98±0,07	60,50±0,78	98,24±0,28
100	80,25±0,46	56,17±0,58	97,56±0,33
50	61,82±2,51	47,11±1,87	71,27±6,30
25	40,32±1,78	39,36±2,08	32,38±5,16
12,5	10,99±1,78	*	15,44±7,97
6,25	*	*	7,98±8,13
3,125	*	*	
1,56	*	*	

* navedene kiseline nisu pokazale djelovanje pri ispitivanim koncentracijama

Ispitana je kelirajuća aktivnost etanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Micromeria* u padajućem koncentracijskom nizu od 640 µg/mL do 20 µg/mL, a rezultati su prikazani na Slici 35 i Tablici 35. Sposobnost keliranja iona željeza(II) pokazali su ekstrakti u

koncentracijama višim od 80 $\mu\text{g/mL}$ (Slika 35). U koncentracijama do 320 $\mu\text{g/mL}$ vrsta *M. croatica* se pokazala nešto boljim kelatorom ostvarujući učinak od 34-72 %, međutim, pri koncentraciji od 560 $\mu\text{g/mL}$ svi su biljni ekstrakti imali podjednaku moć keliranja s oko 75% učinkovitosti. Prema EC_{50} vrijednostima prikazanim u Tablici 31 vidljivo je da nema značajne razlike između ekstrakata vrsta *M. croatica* (227,47 $\mu\text{g/mL}$) i *M. juliana* (254,33 $\mu\text{g/mL}$), ali su njihove vrijednosti znatno niže od onih za vrstu *M. thymifolia* (336,33 $\mu\text{g/mL}$). U usporedbi sa standardnim kelatorom EDTA, ispitivani ekstrakti imaju značajno slabiju aktivnost, dok ružmarinska kiselina i rutin u testiranom rasponu koncentracija nisu uopće pokazali sposobnost keliranja željezo(II) iona. To upućuje na činjenicu da su za kelirajuću sposobnost ekstrakata odgovorne druge prisutne bioaktivne sastavnice.



Slika 35. Sposobnost keliranja etanolnih ekstrakata vrsta *M. croatica*, *M. juliana*, *M. thymifolia*, te ružmarinske kiseline, rutina i referentnog antioksidansa (EDTA). Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

Tablica 35. Usporedne EC₅₀ vrijednosti antioksidacijskog učinka i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta za etanolne ekstrakte vrsta roda *Micromeria*, polifenolne sastavnice i referentne antioksidanse. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

Uzorak	Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH· EC ₅₀ (µg /mL)	Sposobnost keliranja EC ₅₀ (µg /mL)	Redukcijska sposobnost EC ₅₀ (µg /mL)	Ukupni antioksidacijsk i kapacitet mg EAK/g*
<i>M. croatica</i>	4,6±0,57 ^a	227,47±13,06 ^a	9,64±0,40 ^a	470,03±20,58 ^a
<i>M. juliana</i>	7,95±0,20 ^b	254,33±16,17 ^a	12,38±0,20 ^b	265,76±4,82 ^{b,d}
<i>M. thymifolia</i>	8,33±0,72 ^b	336,33±21,83 ^b	17,46 ±1,4 ^c	284,50±10,12 ^{b,d}
Ružmarinska kis.	1,06±0,13 ^c	**	1,64±0,00 ^d	1072,40±11,20 ^c
Rutin	2,82±0,16 ^d	**	26,74±0,06 ^e	304,09±27,71 ^d
BHT	6,45±0,49 ^e	-	4,07±0,05 ^f	694,07±31,59 ^e
EDTA	-	4,78±0,28 ^e	-	-

* rezultati su izračunati iz uzorka koncentracije 10 µg/mL

** navedeni spojevi nisu pokazali djelovanje pri ispitivanim koncentracijama

- navedeni spojevi nisu testirani

Vrijednosti s različitim slovom unutar stupca se međusobno značajno razlikuju (p < 0,05)

4.3.2 Citotoksični učinak

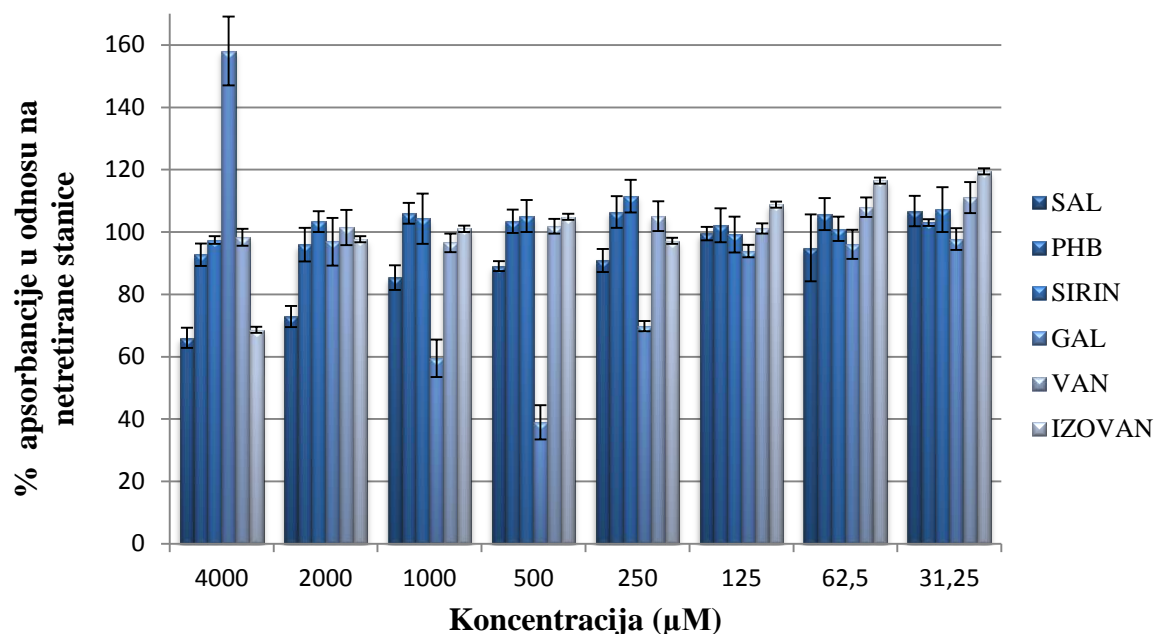
Citotoksičnost je svojstvo nekog ksenobiotika da pri određenoj koncentraciji značajno smanji vijabilnost stanica u nekom test sustavu. U okviru ovog rada testiran je citotoksični učinak fenolnih kiselina i etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* na staničnu liniju humanog hepatocelularnog karcinoma (HepG2) i humane monocitne leukemije (THP 1) primjenom MTS testa.

4.3.2.1 Citotoksični učinak fenolnih kiselina

Citotoksični učinak hidroksibenzojevih kiselina ispitan je na HepG2 i THP 1 staničnim linijama u padajućem koncentracijskom nizu od 4000 μM do 31,5 μM . Iz rezultata prikazanih na Slici 36 vidljivo je da niti jedna testirana hidroksibenzojeva kiselina u najvišoj ispitivanoj koncentraciji nije pokazala značajan citotoksični učinak na HepG2 staničnoj liniji (postotak inhibicije rasta stanica u odnosu na kontrolu veći od 50%). U toj koncentraciji *p*-hidroksibenzojeva, siringična i vanilinska kiselina nisu djelovale citotoksično, dok su salicilna i izovanilinska kiselina pokazale blago citotoksično djelovanje (66,0% i 68,61% živih stanica). Galna kiselina pri koncentraciji 4000 μM stimulirala je rast stanica (158,09% živih stanica u odnosu na kontrolu), dok je pri koncentraciji 500 μM pokazala citotoksični učinak, pri čemu je preživjelo samo 38,95% stanica u odnosu na kontrolu (Slika 36). Koncentracije pri kojima salicilna i izovanilinska kiselina djeluju blago citotoksično dosta su visoke te preračunate u $\mu\text{g/mL}$ iznose 552,48 $\mu\text{g/mL}$ i 672,6 $\mu\text{g/mL}$, što je više od onih korištenih za testiranje antioksidacijskog djelovanja. Za razliku od navedenog, citotoksični učinak galne kiseline pri koncentraciji od 500 μM (85,06 $\mu\text{g/mL}$), nalazi se u rasponu koncentracija kojima je testirano antioksidacijsko djelovanje.

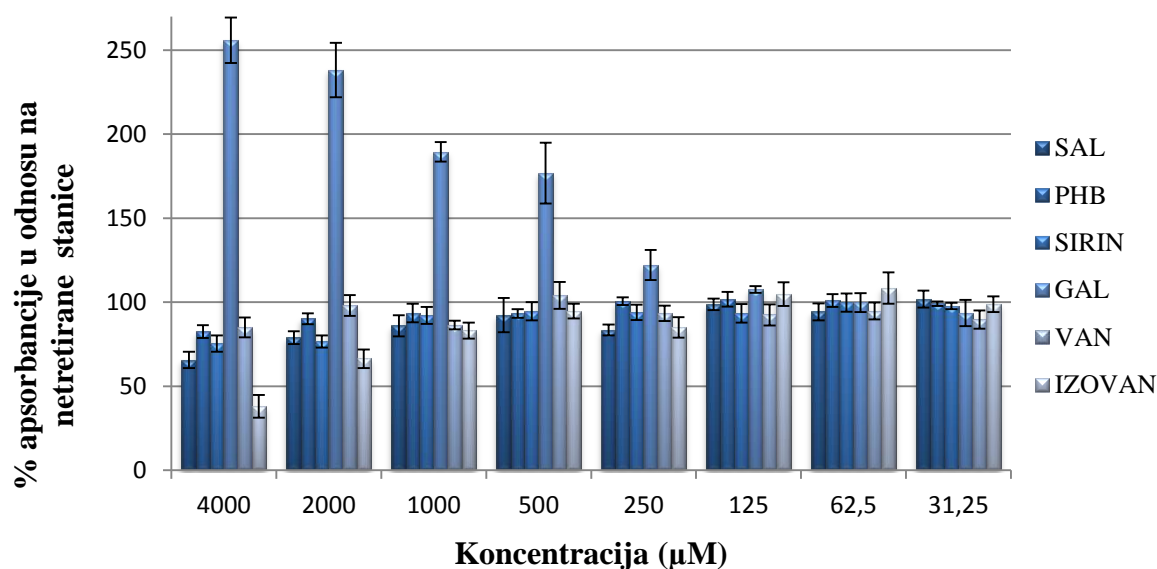
Citotoksični učinak na THP 1 staničnoj liniji pokazala je izovanilinska kiselina u najvišoj testiranoj koncentraciji, pri čemu je udio preživjelih stanica bio 38,06%. Vrijednost EC_{50} iznosila je 3000 μM , što odgovara 504,42 $\mu\text{g/mL}$. No, već pri koncentraciji 500 μM (84,08 $\mu\text{g/mL}$) učinak je izostao, uz postotak preživjelih stanica od 94,74%. Salicilna i siringična kiselina su pri koncentraciji 4000 μM pokazale blagi citotoksični učinak (65,69% i 75,43%). Nasuprot navedenom, u najvišoj testiranoj koncentraciji galna kiselina pokazala je izrazito stimulirajuće djelovanje na rast THP 1 stanica (255,95%), dok ostale ispitivane

hidroksibenzojeve kiseline u testiranim koncentracijama nisu utjecale na vijabilnost stanica (Slika 37).



Slika 36. Citotoksični učinak hidroksibenzojevih kiselina na HepG2 staničnu liniju. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

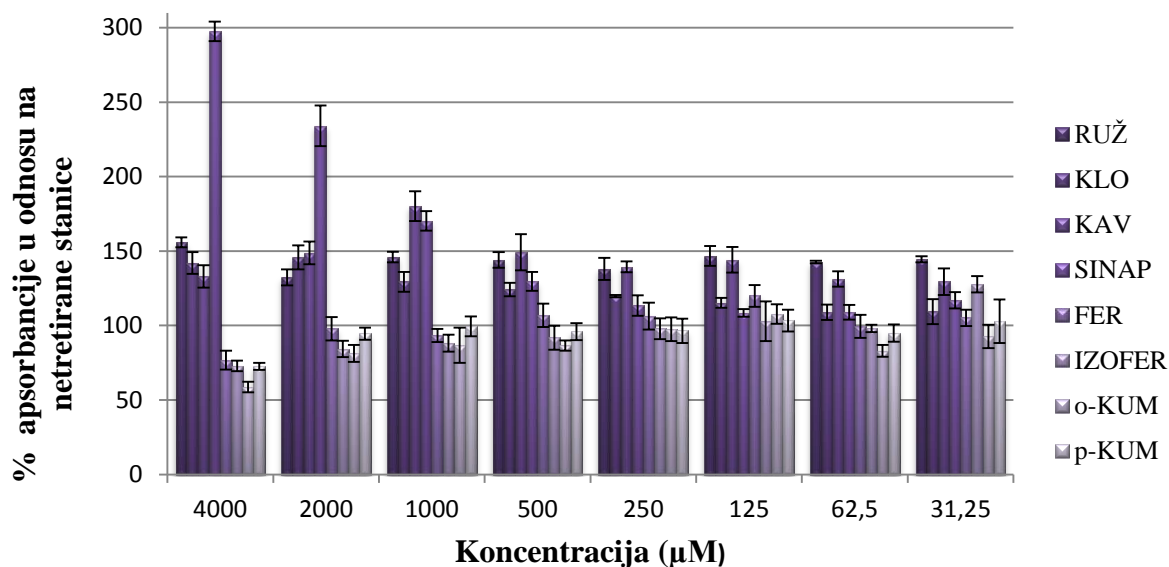
SAL - salicilna kiselina; PHB – *p*-hidroksibenzojeva kiselina;; SIRIN – siringična kiselina; GAL – galna kiselina; VAN – vanilinska kiselina; IZOVAN – izovanilinska kiselina



Slika 37. Citotoksični učinak hidroksibenzojevih kiselina na THP 1 staničnu liniju. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

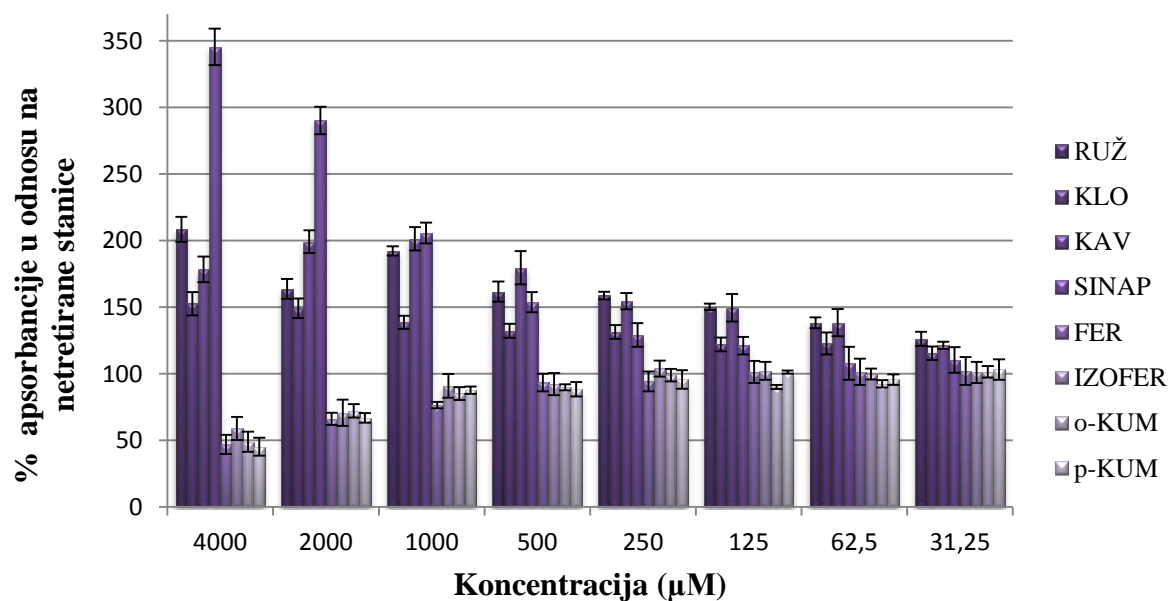
SAL - salicilna kiselina; PHB – *p*-hidroksibenzojeva kiselina;; SIRIN – siringična kiselina; GAL – galna kiselina; VAN – vanilinska kiselina; IZOVAN – izovanilinska kiselina

Prema ostvarenom učinku na proliferaciju HepG2 stanica, hidroksicimetne kiseline možemo svrstati u dvije skupine. Prvu skupinu čine ružmarinska, klorogenska, kavena i sinapinska kiselina koje su stimulirale rast stanica, s posebnim naglaskom na sinapinsku kiselinu koja je u koncentracijskom nizu od 4000 μM do 31,5 μM pokazala stimulirajući učinak u rasponu od 297,54% do 116,93%. Drugu skupinu čine ferulična, izoferulična i *p*-kumarinska kiselina koje su pri najvišim testiranim koncentracijama pokazale blago citotoksično djelovanje, s rastom stanica 76,76%, 72,95% i 72,57% u odnosu na kontrolu. *Orto*-kumarinska kiselina pokazala je značajniji inhibicijski učinak, uz rast stanica 58,70%, ali nije dosegla IC_{50} vrijednost (Slika 38). Pri koncentraciji od 500 μM (82,08 $\mu\text{g/mL}$) postotak preživljavanja stanica iznosio je 86,54%. Sličan učinak opažen je i pri ispitivanju na THP 1 stanicama. Ružmarinska, klorogenska, kavena i sinapinska pokazale su stimulirajući učinak na rast stanica u svim testiranim koncentracijama. Sinapinska kiselina ponovo je pokazala vrlo izražen stimulirajući učinak od 345,47% rasta stanica u odnosu na kontrolu. Ferulična, *o*-kumarinska i *p*-kumarinska kiselina u najvišoj testiranoj koncentraciji pokazale su citotoksični učinak dosegnuivši IC_{50} vrijednost (46,96%, 49,00% i 45,22% rasta stanica u odnosu na kontrolu), dok izoferulična kiselina (rast stanica od 59,03%) u navedenoj koncentraciji nije dosegla IC_{50} vrijednost. U sljedećoj testiranoj koncentraciji 2000 μM ove četiri kiseline pokazale su blagi citotoksični učinak (Slika 39). Ferulična, izoferulična, *o*- i *p*-kumarinska kiselina pri testiranoj koncentraciji 500 μM (97,10 $\mu\text{g/mL}$ i 82,08 $\mu\text{g/mL}$) nisu pokazale citotoksično djelovanje (preživljavanje stanica je 93,46%, 92,15%, 89,82% i 88,40%). Iz navedenih mjerenja vidljivo je također da citotoksične koncentracije ovih kiselina nisu sukladne onim koncentracijama u kojima navedene kiseline pokazuju dobar antioksidacijski učinak.



Slika 38. Citotoksični učinak hidroksicimetnih kiselina na HepG2 staničnu liniju. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

RUŽ – ružmarinska kiselina; KLO - kiselina; KAV - kavena kiselina; SINAP – sinapinska kiselina; FER – ferulična kiselina; IZOFER - izoferulična kiselina; o-KUM – o-kumarinska kiselina; p-KUM – p-kumarinska kiselina



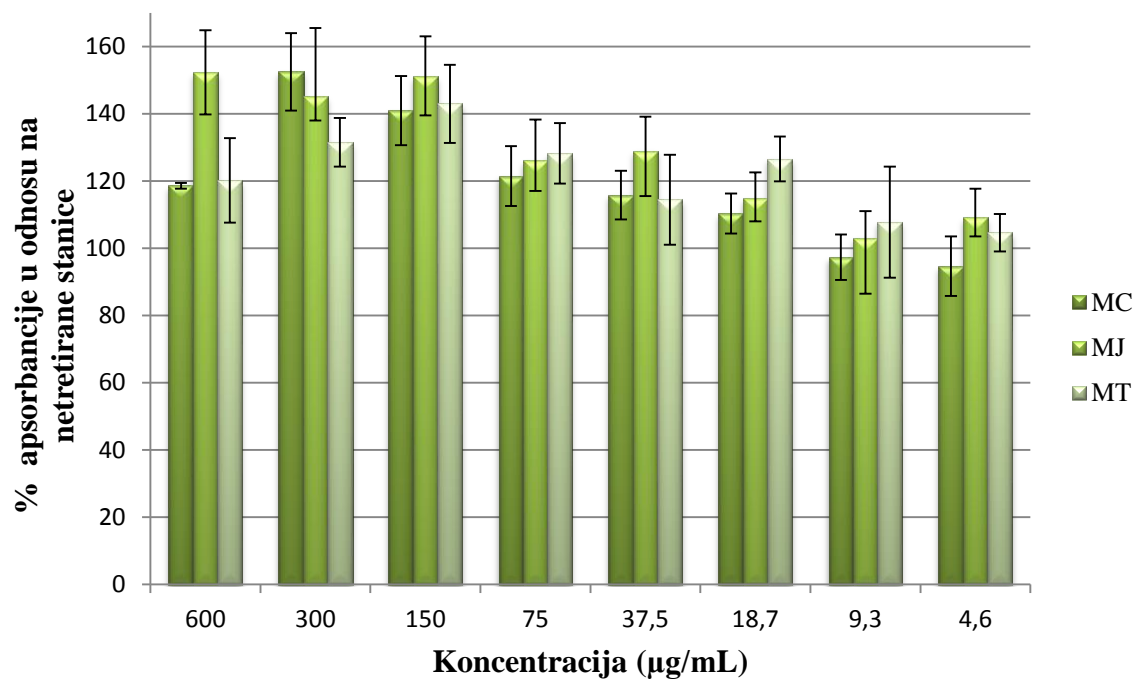
Slika 39. Citotoksični učinak hidroksicimetnih kiselina na THP 1 staničnu liniju. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

RUŽ – ružmarinska kiselina; KLO - kiselina; KAV - kavena kiselina; SINAP – sinapinska kiselina; FER – ferulična kiselina; IZOFER - izoferulična kiselina; o-KUM – o-kumarinska kiselina; p-KUM – p-kumarinska kiselina

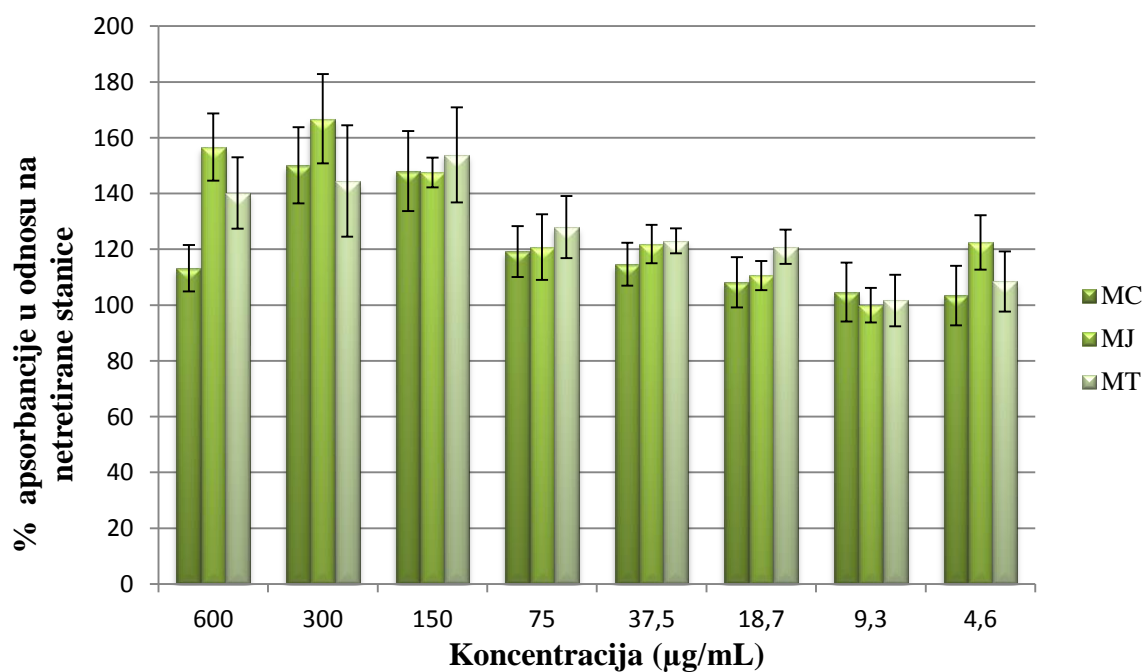
Istražujući učinak ekstrakta ružmarina na humane tumorske stanice, Yesil-Celiktas i suradnici (2010) došli su do zaključka da ružmarinska kiselina u koncentraciji 50 µg/mL uzrokuje proliferaciju gotovo svih testiranih stanica, posebice stanica kronične mijeloične leukemije K-562, čija je vijabilnost iznosila 205%. To je u korelaciji s našim rezultatima testiranja na THP i HepG2 staničnim linijama, gdje je ružmarinska kiselina stimulirala rast stanica u svim testiranim koncentracijama. Prethodnim ispitivanjima kavene kiseline ustanovljeno je da ona djeluje citotoksično na stanice raka kolona ostvarujući EC₅₀ vrijednost pri koncentraciji 800 µM (Jaganathan, 2012), što se ne podudara s našim rezultatima kada je u svim testiranim koncentracijama uzrokovala proliferaciju HepG2 i THP 1 stanica. Peng i suradnici (2013) ustanovili su citotoksični učinak 2 mM ferulične kiseline na T24 stanicama (stanice karcinoma mokraćnog mjehura) u ovisnosti o vremenu izlaganja. U vremenskim intervalima od 24, 48 i 72 sata ferulična kiselina smanjila je staničnu vijabilnost na 72%, 53% i 36%. Shailasree i suradnici (2015) ispitali su učinak 150 µM p-kumarinske kiseline na N2a stanicama (stanice neuroblastoma), pri čemu je došlo do smanjenja vijabilnosti, posebice nakon 72 sata. Učinak je bio proporcionalan porastu koncentracije (1-200 µM), a EC₅₀ vrijednost ostvarena je pri 104 µM. Sinapinska kiselina djelovala je citotoksično na HeLa i HT29 stanice, uz EC₅₀ vrijednost 2,35 mM i 2,97±0,05 mM (Senawong i sur., 2013.), što nije u skladu s proliferativnim djelovanjem na HepG2 i THP 1 stanice ustanovljenim u našim istraživanjima. Galna kiselina je pri koncentraciji 100 µg/mL djelovala citotoksično na stanice glioma T98G (Paolini i sur., 2015.). U našim istraživanjima takav učinak pokazala je samo jedna testirana koncentracija galne kiseline od 500 µM (85,06 µg/mL) na HepG2 stanicama. Suprotan učinak ostvarila je 4000 µM galna kiselina, dok ostale koncentracije nisu značajno utjecale na vijabilnost stanica.

4.3.2.2. Citotoksični učinak odabranih vrsta roda *Micromeria*

Etanolni ekstrakti vrsta *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* nisu u testiranim koncentracijama pokazali citotoksični učinak na stanične linije HepG2 i THP 1. Naprotiv, u koncentracijama većim od 9,3 mg/mL stimulirale su rast stanica (Slike 40 i 41).



Slika 40. Citotoksični učinci etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* na HepG2 stanice. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja; MC - *M. croatica*, MJ - *M. juliana*, MT - *M. thymifolia*



Slika 41. Citotoksični učinci etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* na THP 1 stanice. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja; MC - *M. croatica*, MJ - *M. juliana*, MT - *M. thymifolia*

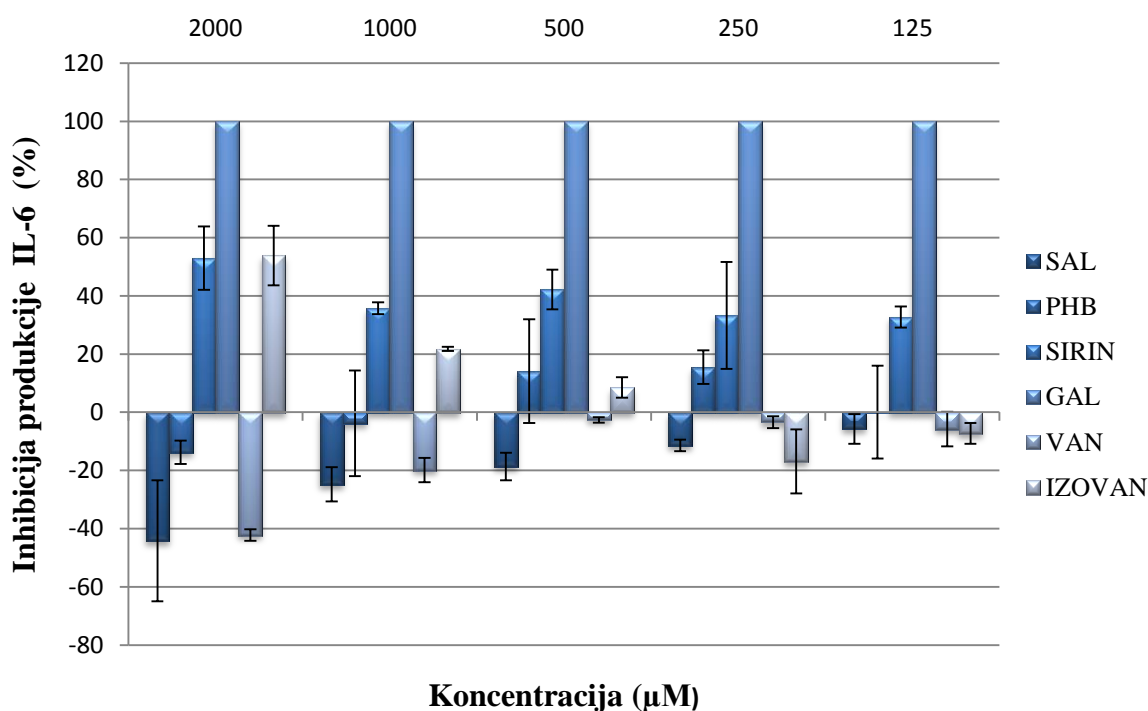
4.3.3 Protuupalni učinak

Upala je reakcija živoga tkiva na ozljedu bilo kojega fizičkog, kemijskog ili biološkog uzroka. Riječ je o vremenskom slijedu dinamičkih promjena (vaskularnih, neuroloških, humoralnih i celularnih) koje se zbivaju lokalno u tkivu zahvaćenom upalom. Upalna reakcija posredovana je brojnim kemijski aktivnim tvarima s lokalnim i sistemskim djelovanjem. Citokini su niskomolekularni glikoproteini koji posreduju u međustaničnoj komunikaciji. Potiču aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica, posreduju ili reguliraju imunoreakcije i upalne procese, a mogu djelovati i citotoksično. Citokini se dijele na interleukine, interferone, citoksine i čimbenike rasta hematopoeznih kolonija. Po funkciji se mogu svrstati u četiri skupine: citokini urođene imunosti (proupalni citokini), citokini stečene imunosti, čimbenici rasta kolonija i imunosupresijski (inhibicijski) citokini. Interleukini su dobili ime po tome što ih luče leukociti i djeluju na leukocyte. Danas se ipak zna da interleukine mogu lučiti i druge stanice te da oni djeluju i na neleukocitne stanice. Citokini se obično luče i djeluju u kaskadi tvoreći složenu citokinsku mrežu putem koje djeluju na različite ciljne stanice, nadzirući tako funkcije urođene i specifične imunosti (Andreis i sur., 2010).

4.3.3.1 Učinak fenolnih kiselina na produkciju citokina IL-6

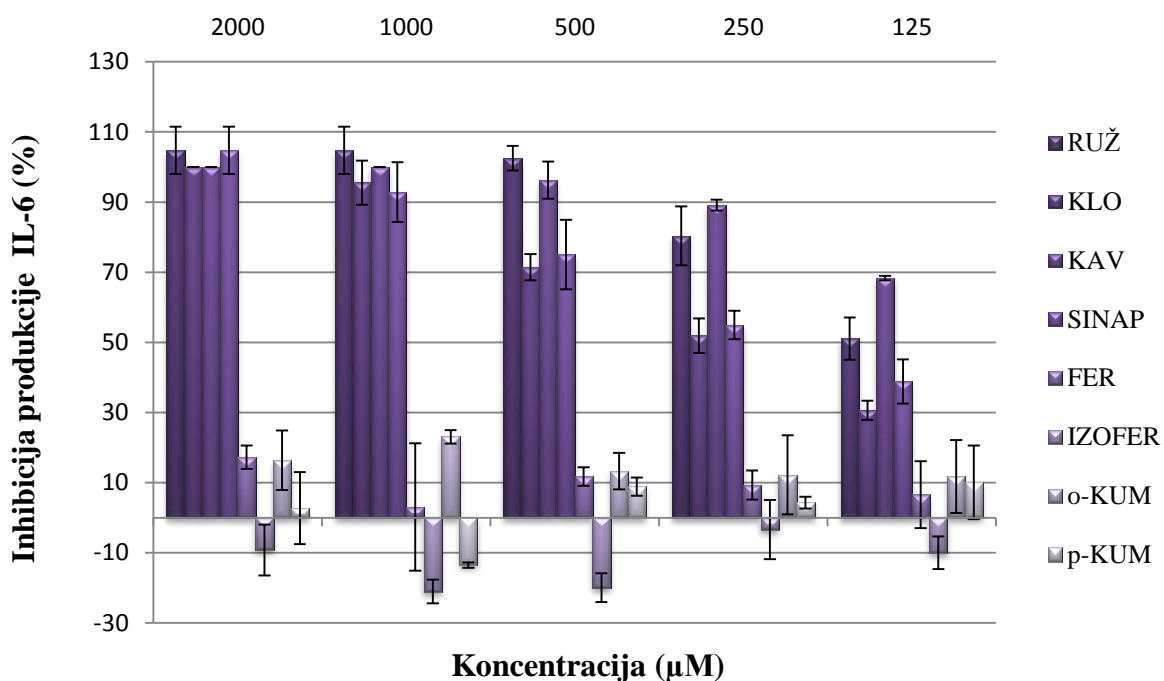
Interleukin 6 (IL-6) je pleiotropan citokin sa značajnim ulogama u regulaciji imunološkog sustava. Regulira i hematopoetski sustav i uzrokuje reakciju akutne faze upale. IL-6 potiče sazrijevanje megakariocita, stimulira hepatocyte, potiče stvaranje imunoglobulina od aktiviranih limfocita B, pojačava stvaranje limfocita T, te regulira ekspresiju IL-2R. Stvaraju ga ne samo imune stanice nego i mnoge neimune stanice i organi. Svoje biološke učinke ostvaruje putem membranskih receptora za IL-6 koji se nalaze na mnogim stanicama uključujući megakariocyte (Čulić, 2005). Kao proupalni citokin, IL-6 ima ključnu ulogu u obrani domaćina protiv patogena te kod akutnog stresa, međutim, pojačana ekspresija IL-6 doprinosi patogenezi raznih bolesti (Yao i sur., 2014). Tako su, primjerice, povišene vrijednosti IL-6 nađene u serumu i sinovijalnoj tekućini pacijenata s reumatoidnim artritismom kao i u serumu pacijenata s Chronovom i Castelmanovom bolesti (Kishimoto, 2010).

Protuupalno djelovanje fenolnih kiselina ispitano je na mišjim splenocitima metodom „sendvič“ ELISA-e, a rezultati su prikazani na Slikama 42 i 43. Značajnim inhibicijskim učinkom smatra se $\geq 50\%$ -tna inhibicija, međutim, galna kiselina je u potpunosti inhibirala produkciju IL-6 pri svim testiranim koncentracijama (125-2000 μM). Siringična i izovanilinska kiselina su samo pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji pokazale značajan inhibicijski učinak (53,00% i 53,85%), dok su pri nižim koncentracijama djelovale slabije. *Para*-hidroksibenzojeva kiselina pokazala je vrlo slabu stimulaciju ili inhibiciju, dok su salicilna i vanilinska kiselina pri svim ispitivanim koncentracijama inducirale produkciju IL-6, pri čemu je za salicilnu kiselinu taj učinak bio ovisan o testiranoj koncentraciji (od -44,20% do -5,70%).



Slika 42. Utjecaj hidroksibenzojevih kiselina na produkciju IL-6 u mišjim splenocitima stimuliranim LPS-om. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.
SAL - salicilna kiselina; PHB – *p*-hidroksibenzojeva kiselina;; SIRIN – siringična kiselina; GAL – galna kiselina; VAN – vanilinska kiselina; IZOVAN – izovanilinska kiselina

Na Slici 43 prikazani su rezultati testiranja protuupalnog učinka hidroksicimetnih kiselina. Vidljiva je snažna inhibicija produkcije IL-6 koju su uzrokovale sve testirane koncentracije ružmarinske, klorogenske, kavene i sinapinske kiseline (125-2000 μ M). Među njima su se posebice isticale ružmarinska i kavena kiselina koje su smanjenjem koncentracije najduže zadržavale 100%-tni učinak. Za razliku od navedenog, ferulična, *o*- i *p*-kumarinska kiselina pokazale su zanemarivo slabu inhibiciju, dok je za izoferuličnu zabilježena slaba stimulacija produkcije IL-6.



Slika 43. Utjecaj hidroksicimetnih kiselina na produkciju IL-6 u mišjim splenocitima stimuliranim LPS-om. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

RUŽ – ružmarinska kiselina; KLO – kiselina; KAV – kavena kiselina; SINAP – sinapinska kiselina; FER – ferulična kiselina; IZOFER – izoferulična kiselina; o-KUM – o-kumarinska kiselina; p-KUM – p-kumarinska kiselina

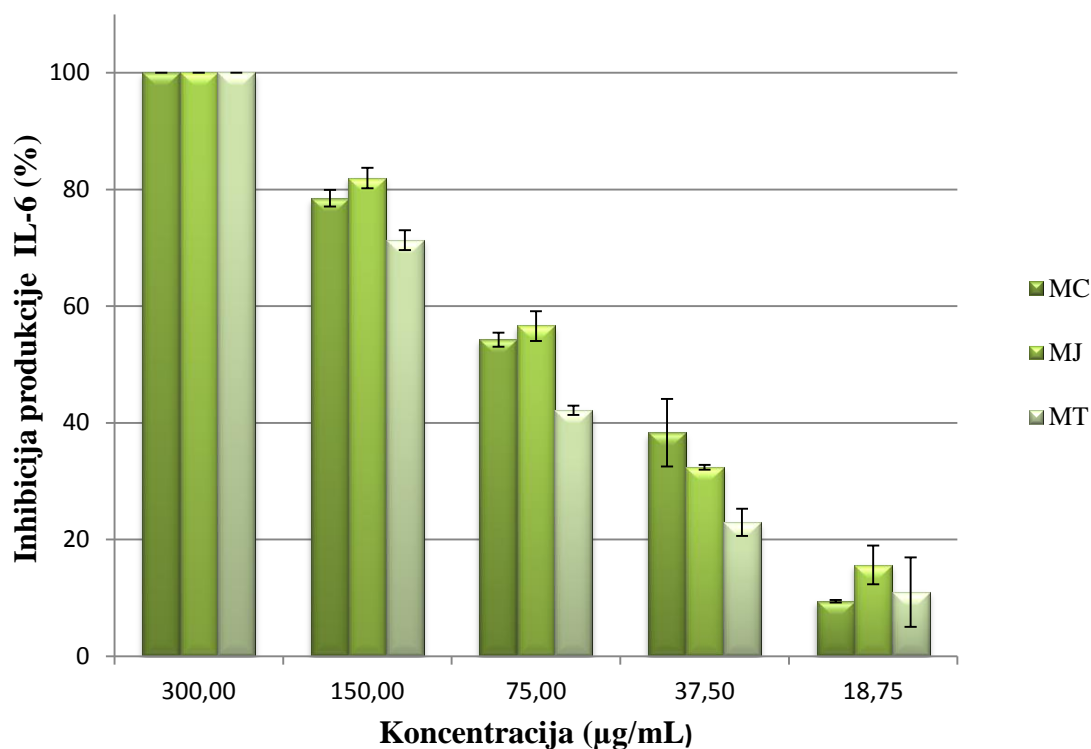
Protuupalno djelovanje ružmarinske kiseline (4-100 nM), usporedno s biljnim ekstraktima, testirali su Mueller i suradnici (2010) na komercijalno dostupnim staničnim linijama makrofaga. Ostvaren je 50%-tni inhibični učinak ružmarinske kiseline na IL-6 već pri koncentraciji od 100 nM. U našem istraživanju navedeni učinak zabilježen je za znatno veću koncentraciju od 125 μ M. Ustanovljene razlike moguće su posljedica korištenja

različitih staničnih linija i protokola. U okviru ispitivanja inhibitornog učinka ekstrakta biljke *Geranium thunbergii*, Liu i Woo (2008) testirali su djelovanje galne i protokatehinske kiseline te metilnog estera galne kiseline. Pri koncentraciji od 100 µg/mL galna kiselina inhibirala je 62,4%, protokatehinska 39,2%, a metilni ester galne kiseline 57,6% produkcije IL-6. Zanimljivo je primijetiti odnos strukture i djelovanja ovih triju biljnih sastavnica. Galna kiselina ima tri slobodne hidroksilne skupine i pokazala je najbolji protuupalni učinak, dok je protokatehinska kiselina s dvije slobodne OH skupine djelovala slabije. Pokazalo se da metiliranje karboksilne skupine značajno ne utječe na protuupalnu aktivnost. Rezultati provedenih prethodnih istraživanja ukazuju da se mehanizam protuupalnog djelovanja može povezati s antioksidacijski učinkom koji je na sličan način uvjetovan strukturnim obilježjima fenolnih kiselina. Galna kiselina je u spomenutim prethodnim istraživanjima pokazala nešto slabiji učinak u ovisnosti o koncentraciji u odnosu na naše rezultate. Pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji od 125 µM (21,3 µg/mL) ostvarila je 100%-tnu inhibiciju IL-6. Rezultate nije moguće usporediti zbog činjenice da su Liu i Woo testirali inhibiciju IL-6 na komercijalno dostupnoj staničnoj liniji izvedenoj iz kosti čovjeka (MG-63).

Usporedbom djelovanja stupnja hidroksilacije aromatskog prstena te duljine bočnog lanca na sekreciju citokina u perifernoj krvi, Monagas i suradnici (2009) došli su do zaključka da dihidroksilirane fenolne kiseline posjeduju značajan protuupalni učinak, dok se promjene u bočnom lancu nisu pokazale presudnima za taj učinak. Uspoređujući 3-hidroksifenil propionsku, 3,4-dihidroksipropionsku, 3-hidroksi octenu i 3,4-dihidroksi octenu kiselinu primijetili su da 3,4-dihidroksi kiseline izrazito smanjuju razinu IL-6, dok monohidroksi kiseline ne inhibiraju produkciju IL-6. Ispitana je i *p*-hidroksibenzojeva kiselina koja nije pokazala protuupalni učinak, što je u skladu s rezultatima dobivenim u okviru ovog rada. Dosadašnje znanstvene spoznaje upućuje na činjenicu da fenolne kiseline temeljem svojih antioksidacijskih svojstava mogu uzrokovati i druge biološke učinke, primjerice protuupalni. Mehanizmi koji su povezani s inhibitornim ili stimulacijskim učinkom polifenola na produkciju citokina mogu biti posljedica transkripcijskih i postranskripcijskih procesa. Ti se mehanizmi ponovo mogu povezati s antioksidacijskim mehanizmom djelovanja, pa je tako transkripcijski faktor NF-κB (odgovoran za aktivaciju niza citokina uključujući TNF-α i IL-1β) redoks osjetljiv, a poznato je da tvari koji posjeduju antioksidativni učinak mogu inhibirati njegovu aktivaciju (Flohé i sur., 1997).

4.3.3.2 Učinak etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* na produkciju citokina IL-6

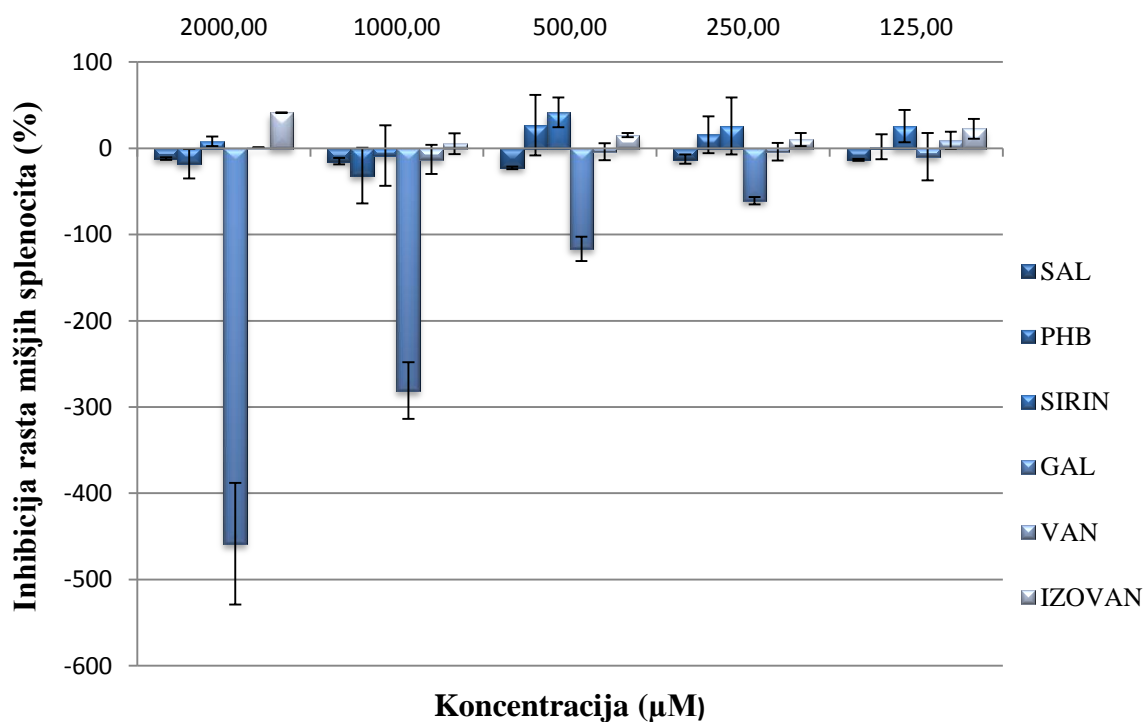
Po prvi put je provedeno testiranje protuupalnog djelovanja etanolnih ekstrakata vrsta *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* u padajućem nizu koncentracija od 300 µg/mL do 18,75 µg/mL. Na Slici 44 prikazan je o koncentraciji ovisan učinak biljnih ekstrakata na produkciju IL-6. Potpunu inhibiciju ovog citokina uzrokovali su ekstrakti u najvišoj testiranoj koncentraciji. Značajan inhibicijski učinak (71,3-81,95%) pokazali su i u koncentraciji 150 mg/mL, dok su pri sljedećoj nižoj koncentraciji od 75 mg/mL učinak veći od 50% zadržale samo vrste *M. croatica* i *M. juliana*. Uočene razlike u djelovanju ekstrakata mogu se objasniti udjelima fenolnih kiselina u ispitivanim biljnim vrstama. Naime, spektrofotometrijski je određeno da vrsta *M. croatica* sadrži najviše hidroksicimetnih derivata (6,45%), a zatim slijede *M. juliana* (5,42%) i *M. thymifolia* (5,26%), a upravo su testirane hidroksicimetne kiseline pokazale snažno inhibitorno djelovanje.



Slika 44. Utjecaj etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* na produkciju IL-6 u mišjim splenocitima stimuliranim LPS-om (MC - *M. croatica*, MJ - *M. juliana*, MT - *M. thymifolia*). Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

4.3.3.3 Citotoksični učinak fenolnih kiselina i biljnih ekstrakata na mišjim splenocitima

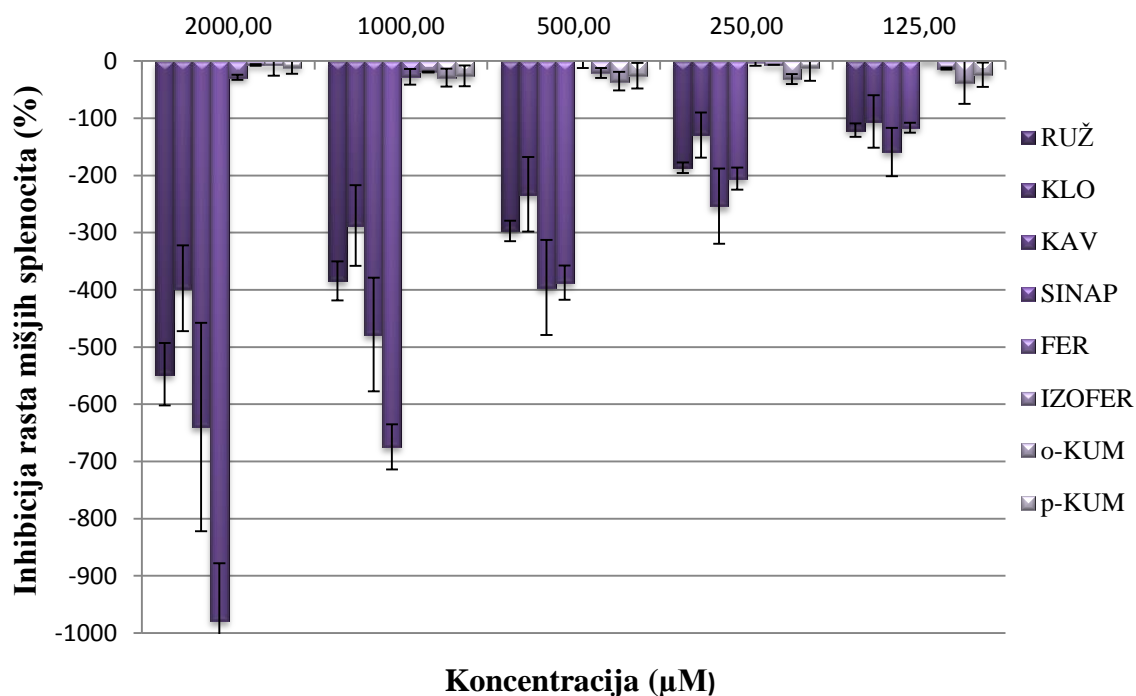
Usporedno s određivanjem protuupalnog učinka, testirano je i potencijalno citotoksično djelovanje ispitivanih fenolnih kiselina i ekstrakata na mišje splenocyte primjenom MTS testa, a rezultati su prikazani na Slikama 45-47. Vidljivo je da siringična i *p*-hidroksibenzojeva kiselina djeluju blago citotoksično pri nižim testiranim koncentracijama 125-500 μ M (25,61-41,74% i 15,61-26,78%). Ovisno o koncentraciji, izovanilinska kiselina također je inhibirala rast stanica (5,37-41,19%). Preostale hidroksibenzojeve kiseline pokazale su blagu stimulaciju rasta stanica, dok je galna kiselina u ovisnosti o koncentraciji stimulirala rast splenocita (9,92%-458,28%).



Slika 45. Citotoksični učinak hidroksibenzojevih kiselina na mišjim splenocitima. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

SAL - salicilna kiselina; PHB – *p*-hidroksibenzojeva kiselina;; SIRIN – siringična kiselina; GAL – galna kiselina; VAN – vanilinska kiselina; IZOVAN – izovanilinska kiselina

Testirane hidroksicimetne kiseline nisu niti u jednoj ispitivanoj koncentraciji pokazale citotoksični učinak, već su stimulirale rast splenocita (Slika 46). Posebice su se istaknule sinapinska i kavena kiselina koje su, u ovisnosti o testiranoj koncentraciji, stimulirale rast od 116,92% do 978,99%. Značajnu stimulaciju rasta mišjih splenocita pokazale su također ružmarinska i klorogenska kiselina (106,65-547,39%), dok je za ostale zabilježeno blago djelovanje.

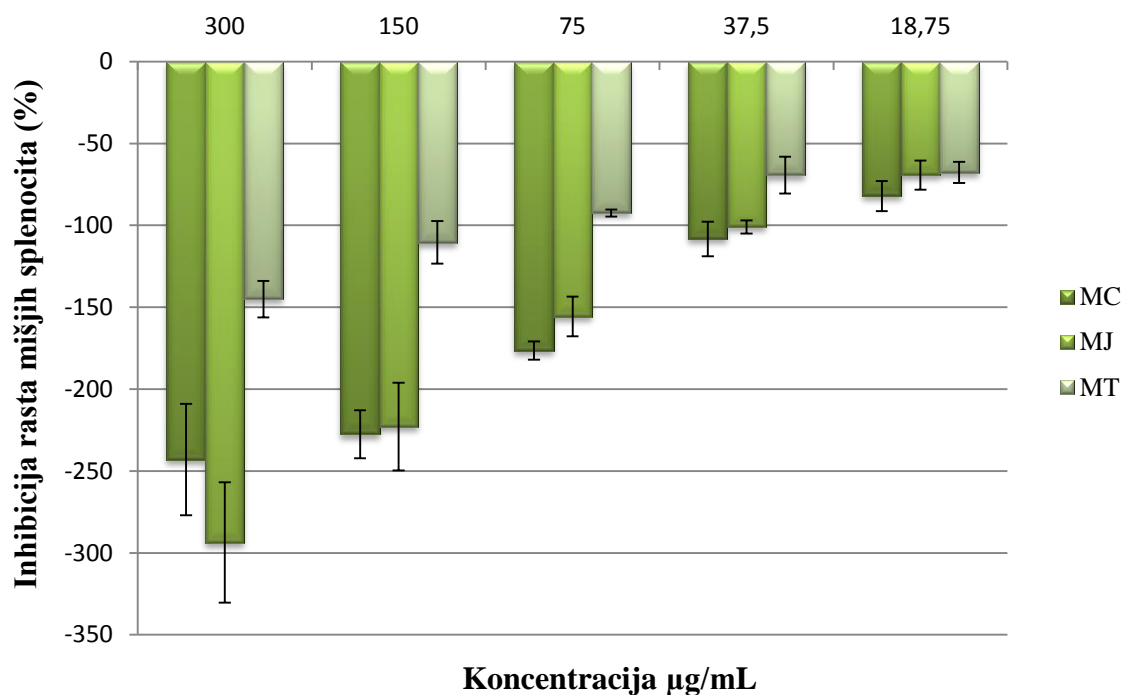


Slika 46. Učinak hidroksicimetnih kiselina na proliferaciju mišjih splenocita. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

RUŽ – ružmarinska kiselina; KLO - kiselina; KAV - kavena kiselina; SINAP – sinapinska kiselina; FER – ferulična kiselina; IZOFER - izoferulična kiselina; o-KUM – o-kumarinska kiselina; p-KUM – p-kumarinska kiselina

Testirani ekstrakti vrsta roda *Micromeria* nisu djelovali citotoksično, već su pokazali stimulirajući učinak na rast mišjih splenocita u ovisnosti o koncentraciji (Slika 47). Vrste *M. juliana* i *M. croatica* djelovale su nešto snažnije u odnosu na vrstu *M. thymifolia*. U najvišoj testiranoj koncentraciji od 300 µg/mL biljni ekstrakti stimulirali su rast splenocita od 145,13% do 293,67%.

Iz ovih rezultata je vidljivo da inhibicija produkcije IL-6 nije posljedica citotoksičnog djelovanja ispitanih kiselina i ekstrakata na mišje splenocite, uz izuzetak siringične (pri koncentraciji 500 μ M inhibira rast mišjih splenocita za 41,47%) i izovanilinske kiseline (pri koncentraciji 2000 μ M inhibira rast mišjih splenocita za 41,19%)



Slika 47. Učinak etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* na proliferaciju mišjih splenocita (MC - *M. croatica*, MJ - *M. juliana*, MT - *M. thymifolia*). Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardnu devijaciju triju neovisnih određivanja.

4.3.4 Antigenotoksični učinak

Komet test ili elektroforeza pojedinačnih stanica u agaroznom gelu je brza, osjetljiva i jednostavna tehnika za otkrivanje oštećenja i popravaka u molekuli DNA koja omogućuje otkrivanje velikog broja različitih oštećenja genoma, primjerice jednolančane i dvolančane lomove DNA, adukte u molekuli DNA te apurinska i apirimidnska mjesta i mjesta DNA-protein veza. Tijekom elektroforeze mali fragmenti DNA koji su nastali jednolančanim ili dvolančanim lomovima putuju prema anodi kroz pore gela, dok glavina DNA zbog velike molekularne mase nema tu sposobnost. Kraći fragmenti putuju brže pa zbog razlike u njihovoj duljini i brzini kretanja dolazi do razdvajanja prema veličini. Nakon bojenja fluorescencijskom bojom, molekula DNA i obrasci putovanja njezinih fragmenata vidljivi su pod mikroskopom kao kometi, po čemu je i test dobio ime (Kopjar i sur., 2002). Analiza i mjerenje kometa na različitim vrstama stanica, primjerice, krvnim stanicama, epitelnim stanicama ili spermatozoidima provodi se primjenom epifluorescencijskog mikroskopa i računalnog programa za analizu slike. Najčešće se mjere tri osnovna parametra: dužina repa kometa, intenzitet repa i repni moment. Najveća udaljenost na koju su otputovali najkraći fragmenti DNA je duljina repa (*tail lenght*, TL), a obično se mjeri od sredine glave ili ruba glave kometa i izražava u mikrometrima. Postotak DNA koja je migrirala u rep u odnosu na ukupnu količinu DNA u kometu označava se kao intenzitet repa (*tail intensity*, TI). Repni moment (*tail moment*, TM) je umnožak dužine repa i postotka DNA u repu, a izračunava ga računalni program pomoću različitih formula. Kometni parametri klasificiraju se i prema 95.-toj percentili (AST, *abnormal size tails*) u negativnoj kontroli. AST je važan pokazatelj oštećenja DNA jer se prate abnormalno povećani kometni parametri u odnosu na netretirane stanice. Oštećenja DNA koja mjerimo komet testom posljedica su izravnog utjecaja genotoksičnog agensa ili nepotpunog popravka DNA isjecanjem baza, međutim, oštećenju DNA pridonosi i oksidacijski stanični stres uzrokovan djelovanjem reaktivnih kisikovih radikala koji nastaju spontano i pod utjecajem genotoksičnih tvari (Pfeiffer i sur., 2000; Kopjar i sur., 2010).

Bovericin (BEA) je cikloheksadepsipeptid odnosno ciklički ester trimer amida N-metil-L-fenilalanina i D- α -hidroksiizovalerijanske kiseline kojeg sintetiziraju *Beauveria bassiana*, *Peecilomyces fumeoserosus*, *Peecilomyces tenupies* i *Polyphorus sulephereus* te velik broj vrsta *Fusarium*. Ovaj mikotoksin ima antimikrobno, insekticidno, citotoksično i

apoptotsko djelovanje te je specifični inhibitor kolesterol-aciltransferaze. Toksičnost bovericina uključuje dva mehanizma: najprije dolazi do interakcije bovericina sa staničnom membranom, što uzrokuje povećanje unutarstanične koncentracije Ca^{2+} a zatim, kada je oštećenje membrane dovoljno veliko, dolazi do ulaska bovericina u jezgru stanice i stvaranja adukata s DNA (Jestoi, 2008; Šegvić Klarić i sur., 2010).

4.3.4.1 Antigenotoksični učinak fenolnih kiselina

U Tablicama 36-41 prikazani su rezultati ispitivanja antigenotoksičnog djelovanja fenolnih kiselina primjenom komet testa na stanicama humane krvi. Stanice humane krvi inkubirane su 1 sat s ispitivanim kiselinama u koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$, a zatim još 1 sat s 1 μM bovericinom. Kao negativna kontrola korištena je 1%-tna otopina DMSO-a u RPMI mediju, a 1 μM bovericin bio je pozitivna kontrola.

Ustanovljeno je da hidroksibenzojeve kiseline pokazuju statistički značajno smanjenje duljine repa (10,44-11,74 μm) u odnosu na stanice tretirane bovericinom (25,56 μm), što ukazuje na njihovo protektivno djelovanje (Tablica 36). Hidroksibenzojeve kiseline smanjile su duljinu repa za 55,80-60,69% u odnosu na stanice tretirane bovericinom. Kao kiselina s najboljim antigenotoksičnim djelovanjem istaknula se *p*-hidroksibenzojeva kiselina smanjivši duljinu repa za 60,69%, a gotovo jednako dobro djelovala je i izovanilinska kiselina (59,38%). Hidroksicimetne kiseline također su pokazale statistički značajno smanjenje duljine repa u odnosu na stanice tretirane samo bovericinom (26,56 μm). koje je iznosilo 48,19-57,94%. Najbolji učinak postigla je kavena kiselina, dok je ružmarinska kiselina najslabije djelovala. Iz rezultata prikazanih u Tablici 37 može se uočiti da ružmarinska i klorogenska kiselina pokazuju slabije antigenotoksično djelovanje od kavene kiseline čiji su derivati.

Rezultati mjerenja repnih intenziteta za hidroksibenzojeve kiseline prikazani su u Tablici 38. U odnosu na stanice tretirane bovericinom (7,90%), vrijednosti za testirane kiseline bile su značajno manje (0,03-0,53%) smanjivši vrijednosti repnog intenziteta za više od 90%. Nabolje su djelovale izovanilinska i *p*-hidroksibenzojeva kiselina, dok je galna kiselina pokazala nešto slabiji učinak. Sve su hidroksicimetne kiseline također imale niske vrijednosti repnog intenziteta (0,09-1,71%) u odnosu na vrijednosti dobivene za bovericin (7,90%), čime je neosporno dokazano njihovo protektivno djelovanje (Tablica 39). Ove su kiseline smanjile repni intenzitet u rasponu od 98,90% (kavena kiselina) do 78,41%

(ružmarinska kiselina). Ružmarinska i klorogenska kiselina ponovo su pokazale nešto slabije djelovanje u odnosu na druge hidroksicimetne kiseline, što možemo zaključiti i po postotku AST koji je iznosio 35,33 i 26,66%. Povećanu pojavu AST uočavamo i kod *p*-kumarinske kiseline (22%) i izoferulične kiseline (10,66%) u odnosu na kontrolu (5,3%).

Rejni moment definira se kao umnožak dužine repa i postotka DNA u repu (repnog intenziteta) i koristi se kao najbolji pokazatelj stupnja oštećenja DNA u interpretaciji rezultata komet testa. Vrijednosti repnog momenta za testirane hidroksibenzojeve kiseline prikazane su u Tablici 40. Određene su u širokom rasponu od 0,0029 (izovanilinska) do 0,059 (galna), što je bilo značajno manje u usporedbi s bovericinom (1,480). Izovanilinska i *p*-hidroksibenzojeva kiselina gotovo su u potpunosti smanjile učinak boverivina. U Tablici 41 vidljive su nešto veće vrijednosti za hidroksicimetne kiseline (0,009-0,209), ali još uvijek značajno manje od pozitivne kontrole. Djelovanjem se izdvojila kavena kiselina koje je za 99,37% smanjila vrijednosti repnog momenta u odnosu na stanice tretirane bovericinom, dok su klorogenska i ružmarinska kiselina imale slabiji učinak smanjivši vrijednosti repnog momenta za 90,70 i 85,89%. Ujedno su imale i najviši postotak AST (23,33% i 31,33%), značajno veći u odnosu na negativnu kontrolu (4,66%). Pojava AST u većem postotku od negativne kontrole zabilježena je i kod *p*-kumarinske kiseline (16,66%) i izoferulične kiseline (7,33%).

Prema svim ispitanim kometnim parametrima može se zaključiti da testirane hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline posjeduju izraženo antigenotoksično djelovanje, uz nešto bolje djelovanje hidroksibenzojevih kiselina, te kao snažne protektivne molekule mogu popraviti oštećenja DNA nastala u stanicama djelovanjem bovericina. Šegvić Klarić i suradnici (2006) dokazali su da bovericin inducira lipidnu peroksidaciju i smanjuje glutation u PK15 stanicama. Razina TBARS (*thiobarbituric acid-reacting substances*) povećavala se u ovisnosti o koncentraciji i vremenu izloženosti bovericinu (0,05-5 µg/mL, 24 i 48 h). Ionoformno djelovanje bovericina vjerojatno utječe na strukturu lipidne stanične membrane i uzrokuje produkciju vodikovog peroksida koji zatim smanjuje antioksidacijski kapacitet stanice. Do povećanja unutarstaničnih ROS u Caco-2 stanicama dolazi pod utjecajem bovericina u koncentraciji 1 µM i 3 µM u razdoblju izlaganja 0-120 minuta, a do smanjenja GSH (reducirana forma glutationa) i povećanja GSSG (oksidirana forma glutationa) dolazi nakon 24-satnog izlaganja stanica 3 µM bovericinu (Prosperini i sur., 2013). GSH se smatra najvažnijim endogenim staničnim antioksidacijskim sustavom enzima: glutation reduktaza

(GR), glutation peroksidaza (GPx) i glutation transferaza (GST). U istraživanju koje su proveli Mallabrera i suradnici (2014) dokazano je da bovericin (0,1-5 μM) povećava udio GPx i GST, dok razinu GR ne mijenja (0,1-1 μM) ili smanjuje (5 μM) u odnosu na kontrolu. Nakon tretiranja CHO-K1 stanica bovericinom u koncentracijama 1-50 μM došlo je do stvaranja ROS (Ferrer i sur., 2009), što također upućuju na oksidacijsko djelovanje bovericina.

Fenolne kiseline su u dosadašnjim istraživanjima pokazale dobar protektivni učinak na oštećenja DNA različite etiologije. Obzirom da UV radijacija uzrokuje upalu, mutaciju gena i imunosupresiju u humanim stanicama kože, Prasad i suradnici (2009) su ispitali protektivni učinak kavene kiseline u koncentracijama 1-10 $\mu\text{g/mL}$ na humanim limfocitima. UVB radijacija uzrokuje povećanje razine lipidne peroksidacije i oštećenja DNA, dok smanjuje antioksidacijski status i preživljavanje stanica. Preinkubacija stanica s kavenom kiselinom dovela je do značajnog smanjenja oštećenja DNA mjerenog komet testom. Preventivno djelovanje ružmarinske kiseline na PC12 stanice tretirane tert-butil hidroperoksidom ispitano je komet testom preinkubacijom kroz tri sata i istovremenom inkubacijom s oksidacijskim agensom. Ružmarinska kiselina (50 μM) je uzrokovala značajno smanjenje oštećenja DNA u odnosu na kontrolu neovisno o vremenu inkubacije. Protektivno djelovanje ružmarinske kiseline značajno se povećalo kad je trajanje oporavka stanica produženo za sat vremena (Silva i sur., 2008). Zaštitni učinak galne kiseline na DNA nakon djelovanja gama zračenja, ispitali su Gandhi i suradnici (2005). Galna kiselina (80 mg/kg) aplicirana je miševima intraperitonealno 30 minuta prije izlaganja subletalnoj dozi gama zračenja. Komet test izveden je na stanicama jetre, a rezultati su pokazali značajno smanjenje kometnih parametara u usporedbi s kontrolnom skupinom koja nije primila galnu kiselinu. Ispitivanja su napravljena i na stanicama ljudskih limfocita koji su tretirani galnom kiselinom u koncentracijama 50-100 μM nakon čega su ozračene gama zrakama jačine 2 Gy. Gama zračenje uzrokovalo je izrazito povećanje kometnih parametara koje je galna kiselina smanjila u ovisnosti o koncentraciji (duljina repa smanjila se s 24,89 μm na 12,55 μm , a repni moment sa 6,65 na 1,88 za ispitivanu koncentraciju 50 μM galne kiseline). Protektivni učinak ekstrakta biljke *Rhus coriaria* L. i galne kiseline kao jedne od glavnih sastavnica na DNA u humanim limfocitima potvrdili su i Chakraborty i suradnici (2009). Ispitali su protektivni učinak nakon tretiranja limfocita vodikovim peroksidom. Preinkubacija limfocita galnom kiselinom u svim ispitivanim koncentracijama (0,005-0,06 $\mu\text{g/mL}$) dovela je do značajnog

smanjenja duljine repa. Usporednim istraživanjem na ljudima i životinjama, Ferk i suradnici (2011) također su došli do zaključka da galna kiselina djeluje protektivno na DNA. Kratko razdoblje izlaganja stanica galnoj kiselini (nakon čega je uslijedilo tretiranje stanica oksidativnim reagensom) u *in vitro* uvjetima nije bilo dovoljno da inducira antioksidacijske enzime, pa je protektivni učinak vjerojatno bio posljedica direktnog hvatanja slobodnih radikala. Nasuprot tome, protektivni učinak u pokusima na štakorima govori u prilog indirektnom mehanizmu djelovanja, vjerojatno indukcijom transkripcije Nrf2 odgovornog za kontrolu gena koji sudjeluju u zaštiti od ROS-a. Ferulična kiselina ispitana je na Wistar štakorima koji su tretirani feruličnom kiselinom u dozi 20 mg/kg, a neposredno nakon toga nikotinom u dozi 2,5 mg/kg. Komet test je pokazao da je u skupini tretiranoj na takav način došlo do značajnog smanjenja kometnih parametara u odnosu na skupinu štakora tretiranih samo nikotinom. Pri tom ferulična kiselina nije djelovala genotoksično (Sundheer i sur., 2008.). Cha i suradnici (2014) ispitali su učinak klorogenske kiseline na UVB posredovan oksidacijski stres na humanim keratinocitima (HaCaT). Izloženost HaCaT stanica UVB zračenju rezultirala je povećanjem intenziteta fluorescencije u repu kometa, pri čemu je DNA fluorescencija u repu zračenih stanica iznosila 74%, nasuprot stanicama pretretiranim klorogenskom kiselinom (20 μ M) kada je bila 30% i također dovela do značajnog smanjenja duljine repa.. Iz pregleda predhodnih istraživanja možemo zaključiti da fenolne kiseline djeluju protektivno na oštećenja DNA uzrokovana raznim oksidacijskim agensima. Iako mehanizam djelovanja nije razjašnjen, vrlo je vjerojatno da fenolne kiseline mogu doprinijeti zaštiti DNA od štetnih utjecaja kroz antioksidacijsko djelovanje, posebice zbog sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i inhibicije lipidne peroksidacije.

Tablica 36. Duljine repa (μm) dobivene komet testom na stanicama humane krvi za hidroksibenzojeve kiseline ($10 \mu\text{g/mL}$)

	PHB	SAL	SIRIN	GAL	VAN	IZOVAN	Kontrola	BOV
N	150	150	150	150	150	150	150	150
\bar{x}	10,44	11,33	11,08	11,74	11,49	10,79	12,37	26,56
SD	0,9076	1,194	0,7829	1,335	1,165	0,8206	1,426	8,098
SEM	0,07410	0,09749	0,06392	0,1090	0,09513	0,06700	0,1164	0,8531
M	10,26	10,90	10,90	11,54	11,54	10,90	12,18	26,60
25%P	9,615	10,90	10,90	8,974	10,90	10,26	11,54	19,87
75%P	10,90	11,54	11,54	12,18	12,18	11,54	13,46	32,60
Min	7,692	8,974	8,974	8,974	8,974	8,333	8,33	8,33
Max	15,38	17,95	13,46	23,08	17,95	12,82	17,95	51,92
P(Kontrola)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0495	0,0010	<0,0001	/	<0,0001
P (BEA)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	/
% AST	0,66	1,30	0	0	0,66	0	2,66	95,33

BOV– $1 \mu\text{M}$ bovericin

PHB – *p*-hidroksibenzojeva kiselina; SAL - salicilna kiselina; SIRIN – siringična kiselina; GAL – galna kiselina; VAN – vanilinska kiselina; IZOVAN – izovanilinska kiselina

Tablica 37. Duljine repa (μm) dobivene komet testom na stanicama humane krvi za hidroksicimetne kiseline ($10 \mu\text{g/mL}$)

	RUŽ	KLO	KAV	FER	IZOFER	SINAP	o-KUM	p-KUM	Kontrola	BOV
N	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
\bar{x}	13,76	12,37	11,17	12,12	11,97	11,79	12,12	12,82	12,37	26,56
SD	2,509	0,9840	1,107	1,120	1,016	1,002	1,338	1,457	1,426	8,098
SEM	0,2049	0,08034	0,09040	0,09143	0,08299	0,08180	0,1093	0,1190	0,1164	0,8531
M	13,46	12,18	10,90	12,18	11,86	11,54	12,18	12,82	12,18	26,60
25%P	12,18	11,54	10,26	11,54	11,54	10,90	11,54	11,86	11,54	19,87
75%P	14,74	12,82	11,54	12,82	12,18	12,18	12,82	12,82	13,46	32,60
Min	9,615	10,26	8,974	7,692	10,26	9,615	9,615	9,615	8,33	8,33
Max	21,79	15,38	15,38	14,74	18,59	14,74	17,31	18,59	17,95	51,92
P(Kontrola)	<0,0001	0,9998	<0,0001	0,8694	0,5222	0,1107	0,7739	0,2896	/	<0,0001
P (BEA)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	/
% AST	20,66*	1,33	0,66	0	0,66	0	2	6	2,66	95,33

BOV - $1 \mu\text{M}$ bovericin

Kontrola - 1% otpina DMSO

RUŽ – ružmarinska kiselina; KLO - kiselina; KAV - kavena kiselina; FER – ferulična kiselina; IZOFER - izoferulična kiselina; SINAP – sinapinska kiselina;

o-KUM – o-kumarinska kiselina; p-KUM – p-kumarinska kiselina

*ispitivana fenolna kiselina u odnosu na kontrolu $p < 0,05$

Tablica 38. Repni intenziteti (%) dobiveni komet testom na stanicama humane krvi za hidroksibenzojeve kiseline (10 µg/mL)

	PHB	SAL	SIRIN	GAL	VAN	IZOVAN	Kontrola	BOV
N	150	150	150	150	150	150	150	150
\bar{x}	0,03592	0,3785	0,1273	0,5381	0,2906	0,02874	0,5611	7,903
SD	0,07369	0,4677	0,1852	0,6261	0,3681	0,07932	0,6495	7,618
SEM	0,006016	0,03819	0,01512	0,05112	0,03006	0,006476	0,05303	0,622
M	0,0	0,2032	0,0	0,3240	0,1545	0,0	0,2598	5,590
25%P	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
75%P	0,0006249	0,6162	0,2336	0,7723	0,4938	0,0	0,9320	12,72
Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max	0,2459	1,792	0,6972	2,790	1,400	0,4797	2,198	35,12
P(Kontrola)	<0,0001	0,6196	0,0027	>0,9999	0,1836	<0,0001	/	<0,0001
P (BEA)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	/
% AST	0	0	0	6	0	0	5,3	75,33

BOV - 1 µM bovericin

Kontrola - 1% otpina DMSO

PHB – p-hidroksibenzojeva kiselina; SAL - salicilna kiselina; SIRIN - siringična kiselina; GAL – galna kiselina; VAN – vanilinska kiselina; IZOVAN –izovanilinska kiselina

Tablica 39. Repni intenziteti (%) dobiveni komet testom na stanicama humane krvi za hidroksicimetne kiseline (10 µg/mL)

	RUŽ	KLO	KAV	FER	IZOFER	SINAP	o-KUM	p-KUM	Kontrola	BOV
N	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
\bar{x}	1,705	1,235	0,08687	0,6332	0,7963	0,3037	0,1840	1,122	0,5611	7,903
SD	1,801	1,012	0,1633	0,5972	0,7759	0,3297	0,2962	1,073	0,6495	7,618
SEM	0,1470	0,08263	0,01333	0,04876	0,06335	0,02692	0,02418	0,08757	0,05303	0,622
M	1,090	0,9864	0,0	0,5603	0,6353	0,1896	0,0	0,8857	0,2598	5,590
25%P	0,3080	0,4161	0,0	0,009922	0,2125	0,0	0,0	0,2100	0,0	0,0
75%P	2,586	2,115	0,1045	1,010	1,102	0,4719	0,2485	1,702	0,9320	12,72
Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max	10,34	3,822	0,6395	1,987	3,329	1,062	1,072	5,037	2,198	35,12
P(Kontrola)	<0,0001	0,0002	0,0038	0,9605	0,3875	0,2839	0,0349	0,0038	/	<0,0001
P (BEA)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	/
% AST	35,33*	26,66*	0	1,33	10,66	0	0	22*	5,3	75,33

BOV - 1 µM bovericin

Kontrola - 1% otpina DMSO

RUŽ – ružmarinska kiselina; KLO - kiselina; KAV – kavena kiselina; FER – ferulična kiselina; IZOFER - izoferulična kiselina; SINAP – sinapinska kiselina;

o-KUM – *o*-kumarinska kiselina; p-KUM – *p*-kumarinska kiselina;

*ispitivana fenolna kiselina u odnosu na kontrolu p<0,05

Tablica 40. Repni momenti dobiveni komet testom na stanicama humane krvi za hidroksibenzojeve kiseline (10 µg/mL)

	PHB	SAL	SIRIN	GAL	VAN	IZOVAN	Kontrola	BOV
N	150	150	150	150	150	150	150	150
\bar{x}	0,003816	0,04079	0,01380	0,05885	0,03249	0,002953	0,06480	1,480
SD	0,008185	0,04925	0,02012	0,06709	0,04108	0,008780	0,07437	1,525
SEM	0,0006683	0,004021	0,001643	0,005478	0,003354	0,0007169	0,006072	0,1246
M	0,0	0,02245	0,0	0,03703	0,01782	0,0	0,03002	0,9351
25%P	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3165
75%P	0,0	0,06909	0,02550	0,08473	0,05535	0,0	0,1129	2,402
Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max	0,0340	0,1944	0,07598	0,3219	0,1720	0,05581	0,2853	7,879
P(Kontrola)	0,5827	0,9798	0,7395	>0,9999	0,9397	0,5686	/	<0,0001
P (BEA)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	/
% AST	0	0	0	2,66	0	0	4,66	78,66

BOV - 1 µM bovericin

Kontrola - 1% otpina DMSO

PHB – p-hidroksibenzojeva kiselina; SAL – salicilna kiselina; SIRIN – siringična kiselina; GAL – galna kiselina; VAN – vanilinska kiselina; IZOVAN – izovanilinska kiselina

Tablica 41. Repni momenti dobiveni komet testom na stanicama humane krv za hidroksicimetne kiseline (10 µg/mL)

	RUŽ	KLO	KAV	FER	IZOFER	SINAP	o-KUM	p-KUM	Kontrola	BOV
N	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
\bar{x}	0,2089	0,1376	0,009317	0,07104	0,08781	0,03369	0,02170	0,1296	0,06480	1,480
SD	0,2307	0,1132	0,01813	0,06689	0,08657	0,03682	0,03464	0,1248	0,07437	1,525
SEM	0,01883	0,009245	0,001480	0,005461	0,007068	0,003006	0,002829	0,01019	0,006072	0,1246
M	0,1257	0,1110	0,0	0,06342	0,07062	0,02163	0,0	0,09874	0,03002	0,9351
25%P	0,03590	0,04731	0,0	0,0002491	0,02552	0,0	0,0	0,02546	0,0	0,3165
75%P	0,3114	0,2312	0,006683	0,1148	0,1210	0,05231	0,03017	0,1852	0,1129	2,402
Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max	1,458	0,4655	0,07748	0,2425	0,4335	0,1182	0,1190	0,5812	0,2853	7,879
P(Kontrola)	0,0203	0,4761	0,7011	0,9999	0,9832	0,9483	0,7977	0,5438	/	<0,0001
P (BEA)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	/
% AST	31,33*	23,33*	0	1,33	7,33	0	0	16,66*	4,66	78,66

BOV - 1 µM bovericin

Kontrola - 1% otpina DMSO

RUŽ – ružmarinska kiselina; KLO - kiselina; KAV – kavena kiselina; FER – ferulična kiselina; IZOFER - izoferulična kiselina; SINAP – sinapinska kiselina;

o-KUM – *o*-kumarinska kiselina; p-KUM – *p*-kumarinska kiselina;

*ispitivana fenolna kiselina u odnosu na kontrolu $p < 0,05$

4.3.4.2 Antigenotoksični učinak vrsta roda *Micromeria*

U Tablici 42 prikazani su rezultati mjerenja duljine repa i repnog intenziteta nakon inkubiranja stanica humane krvi s etanolnim ekstraktima odabranih vrsta roda *Micromeria* (100 µg /mL). Tretiranje stanica sa sva tri ekstrakta dovelo je do smanjenja duljine repa za 60,69% (*M. croatica*) do 48,53% (*M. thymifolia*). Vrijednosti duljine repa iznosile su 10,44 µm odnosno 13,67 µm, dok je duljina repa stanica tretiranih bovericinom bila 26,56 µm. *M. thymifolia* imala je 14% AST, što je više od postotka AST u negativnoj kontroli (2,66%). Sličan učinak potvrđen je i mjerenjem repnog intenziteta, gdje je *M. croatica* u potpunosti smanjila učinak bovericina. Tablica 43. donosi vrijednosti repnih momenta dobivenih za etanolne ekstrakte vrsta roda *Micromeria* (100 µg/mL). Repni moment za vrstu *M. croatica* bio je 0, dok je za ostale dvije vrste te za negativnu kontrolu iznosio približno 0,07, što je višestruko manje od učinka bovericina (1,48). Postotak AST niti za jednu vrstu nije bio veći od negativne kontrole (4,66%).

Prema ispitanim kometnim parametrima može se zaključiti da testirani etanolni ekstrakti posjeduju antigenotoksična svojstva te da najbolji učinak pokazuje vrsta *M. croatica*, što se može pojasniti većim sadržajem fenolnih kiselina u odnosu na druge dvije vrste. Temeljem dosadašnjih znanstvenih spoznaja, može se pretpostaviti da dokazano snažno antioksidacijsko djelovanje navedenih biljnih ekstrakata pridonosi njihovoj sposobnosti popravljavanja DNA oštećenja u stanicama.

Tablica 42. Duljine repa (μm) i repni intenziteti (%) dobiveni komet testom na stanicama humane krvi za etanolne ekstrakte vrsta roda *Micromeria* (100 $\mu\text{g/mL}$)

	Duljine repa					Repni intenziteti				
	Mc	Mj	Mt	Kontrola	BOV	Mc	Mj	Mt	Kontrola	BOV
N	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
\bar{x}	10,44	12,37	13,67	12,37	26,56	0,0	0,5583	0,5006	0,5611	7,903
SD	0,7521	1,118	1,404	1,426	8,098	0,0	1,491	0,4598	0,6495	7,618
SEM	0,06141	0,09131	0,1147	0,1164	0,8531	0,0	0,1217	0,03754	0,05303	0,622
M	10,26	12,18	13,46	12,18	26,60	0,0	0,2720	0,3990	0,2598	5,590
25%P	10,26	11,54	12,82	11,54	19,87	0,0	0,0	0,03243	0,0	0,0
75%P	10,90	12,82	14,74	13,46	32,60	0,0	0,6983	0,8318	0,9320	12,72
Min	8,974	9,615	9,615	8,33	8,33	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max	12,82	16,67	17,95	17,95	51,92	0,0	17,69	1,700	2,198	35,12
P(Kontrola)	<0,0001	0,9998	<0,0001	/	<0,0001	<0,0001	0,9879	0,9992	/	<0,0001
P (BEA)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	/	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	/
% AST	0	2,66	14	2,66	95,33	0	0,66	0	5,3	75,33

BOV - 1 μM bovericin

Kontrola - 1% otpina DMSO

Mc - *M. croatica*, Mj - *M. juliana*, Mt - *M. thymifolia*

Tablica 43. Repni momenti dobiveni komet testom na stanicama humane krvi za etanolne ekstrakte vrsta roda *Micromeria* (100 µg/mL)

	Repni momenti				
	Mc	Mj	Mt	Kontrola	BOV
N	150	150	150	150	150
\bar{x}	0,0	0,06496	0,06505	0,06480	1,480
SD	0,0	0,1635	0,06009	0,07437	1,525
SEM	0,0	0,01335	0,004906	0,006072	0,1246
M	0,0	0,03151	0,05395	0,03002	0,9351
25%P	0,0	0,0	0,003495	0,0	0,3165
75%P	0,0	0,08321	0,1040	0,1129	2,402
Min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max	0,0	1,928	0,2288	0,2853	7,879
P(Kontrola)	0,5384	>0,9999	>0,9999	/	<0,0001
P (BEA)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	/
% AST	0	2	0	4,66	78,66

BOV - 1 µM bovericin

Kontrola - 1% otopina DMSO

Mc - *M. croatica*, Mj - *M. juliana*, Mt - *M. thymifolia*

5 ZAKLJUČCI



U okviru ovog doktorskog rada po prvi put je provedeno opsežno usporedno istraživanje bioloških učinaka 14 prirodnih fenolnih kiselina, prevalidacija metode određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata u biljnim drogama, fitokemijska karakterizacija fenolnih kiselina i flavonoida te biološki učinci odabranih vrsta roda *Micromeria* Benth (Lamiaceae).

Fenolne kiseline i flavonoidi u odabranim vrstama roda *Micromeria*

Prisutnost fenolnih kiselina i flavonida u vrstama *Micromeria croatica* (Pers.) Schott, *M. juliana* (L.) Benth ex Reichenb. i *M. thymifolia* (Scop.) Fritsch dokazana je metodom tankoslojne kromatografije. Primjenom odgovarajućih spektrofotometrijskih metoda određeno je da nadzemni dijelovi ispitivanih vrsta sadrže 9,69-13,06% ukupnih polifenola, među kojima je 5,26-6,84% fenolnih kiselina, 0,01-0,09% flavonoida i 3,07-6,08% trjeslovina. Vrsta *M. croatica* posebice se isticala udjelima polifenolnih sastavnica, uz izuzetak vrste *M. thymifolia* koja je bila najbogatija flavonoidima.

Kvalitativna i kvantitativna analiza ružmarinske kiseline u ispitivanim biljnim vrstama provedena je RP-HPLC-DAD metodom. Liofilizirani etanolni ekstrakti vrste *M. juliana* i *M. thymifolia* sadržavali su 26,01 mg/g i 25,65 mg/g ružmarinske kiseline, dok je njezin udio u ekstraktu vrste *M. croatica* bio gotovo dvostruko manji (13,50 mg/g).

U okviru ovog doktorskog rada po prvi puta provedeno je opsežno istraživanje fenolnih kiselina i flavonoida u ispitivanim vrstama. Primjenom LC-ESI-MS/MS metoda identificirano je 11 fenolnih kiselina. Vrste *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* sadržavale su ružmarinsku, 4-kavenoilkina (kriptoklorogensku), 3-(3,4-dihidroksifenil)mliječnu i salvianolnu kiselinu J. Za razliku od ostale dvije, u vrsti *M. croatica* identificirane su kavene te dimer ružmarinske kiseline. Trimer ružmarinske kiseline identificiran je u vrstama *M. croatica* i *M. juliana*, dok je 3-*p*- i 4-*p*-kavenoilkina kiselinu te salvianolnu kiselinu B sadržavala jedino vrsta *M. thymifolia*. Izuzev ružmarinske i kavene kiseline, ostale fenolne kiseline po prvi put su identificirane u ispitivanim biljnim vrstama.

Primjenom LC-ESI-MS/MS metoda u ispitivanim vrstama identificirano je 15 flavonoida iz skupine flavona, flavonola i flavanona. Ustanovljeno je da vrste *M. croatica* i *M. juliana* sadrže glukuronide luteolina, dok je u vrsti *M. croatica* identificiran i glukuronid apigenina. Pored navedenih flavonskih derivata, prisutnost diosmina potvrđena je u ekstraktu

vrste *M. juliana*. Sastavom flavonoida posebice se istaknula vrsta *M. thymifolia*. Osim već spomenutog diosmina, sadržavala je i aglikone akacetin, diosmetin i luteolin-5/7-metileter, glikozid apigenina s glukozom ili rutinozom kao šećernim dijelom molekule, akacetin-O-acetilglukozil-ramnozil glukozid, glikozide kvercetina (rutin, izokvercitrin) i kemferola (kemferol-3-O-rutinozid, kemferol-3-O-galaktozid/glukozid) i hesperidin (hesperetin-3-O-rutinozid). Izuzev luteolinskih i akacetinskih derivata u vrstama *M. juliana* i *M. thymifolia*, ostali flavonoidi po prvi put su identificirani u ispitivanim vrstama roda *Micromeria*.

Fenolne kiseline u odabranim vrstama porodice Lamiaceae

U okviru ovog rada provedena je prevalidacija farmakopejskih metoda za određivanje ukupnih hidroksicimetnih derivata ili derivata *orto*-dihidroksicimetne kiseline, izraženih kao ružmarinska ili klorogenska kiselina. Ustanovljena je dobra kvaliteta mjerenja u skupini s najmanjom količinom analita, odlično razlučivanje slijepog signala od signala analita, uglavnom homogeni podaci, idealna linearna kalibracijska i analitička prosudbena funkcija, vrlo dobro podudaranje teorijskih i nađenih količina klorogenske/ružmarinske kiseline, vrlo niske granične vrijednosti te visoka preciznost i točnost metode, čime je potvrđena vrijednost izvedbenih značajki i valjanost analitičkih postupaka.

Prevalidiranim spektrofotometrijskim metodama određeni su udjeli ukupnih hidroksicimetnih derivata u listovima, cvjetovima i nadzemnim djelovima 32 odabrane vrste porodice Lamiaceae iz hrvatske flore. Ovisno o prethodno provedenoj kvalitativnoj analizi, primijenjen je postupak koji koristi kao standard klorogensku ili ružmarinsku kiselinu. Ispitane vrste značajno su se razlikovale prema udjelima hidroksicimetnih derivata koji su bili u širokom rasponu od 1,95% (*Acinos arvensis*) do 11,3% (*Satureja subspicata*). Osim vrste *Satureja subspicata*, visokim udjelima hidroksicimetnih derivata isticale su se i vrste *Micromeria graeca* (9,92%), *M. croatica* (7,90%), *M. thymifolia* (7,67%), *Melissa officinalis* (9,86 %), *Origanum vulgare* (8,31%) i *O. heracleoticum* (7,68%).

Biološki učinci odabranih fenolnih kiselina

Antioksidacijski učinak fenolnih kiselina ispitan je primjenom četiri različite spektrofotometrijske metode, u usporedbi s referentnim antioksidansima.

Hidroksicimetne kiseline su pokazale bolja antioksidacijska svojstva u odnosu na većinu hidroksibenzojevih kiselina. Posebice su se istaknule ružmarinska i kavena kiselina s najboljim antiradikalni učinkom ($EC_{50} = 1,01 \mu\text{g/mL}$ i $0,36 \mu\text{g/mL}$) i redukcijskom snagom ($EC_{50} = 1,97 \mu\text{g/mL}$ i $2,22 \mu\text{g/mL}$). Antioksidacijski kapacitet hidroksicimetnih kiselina testiranih pri $200 \mu\text{g/mL}$ bio je ekvivalentan vitaminu C u koncentracijama $58,00$ - $62,52 \mu\text{g/mL}$, izuzev *o*-kumarinske koja nije djelovala.

Među hidroksibenzojevim kiselinama, galna kiselina pokazala je najbolju sposobnost hvatanja DPPH slobodnog radikala ($EC_{50} = 0,24 \mu\text{g/mL}$), najveću redukcijsku snagu ($EC_{50} = 1,25 \mu\text{g/mL}$) i najveći antioksidacijski kapacitet ostvarujući pri koncentraciji $200 \mu\text{g/mL}$ djelovanje ekvivalentno $54,45 \mu\text{g/mL}$ vitamina C.

Ustanovljeno je da jedino *p*-hidroksibenzojeva i salicilna kiselina imaju sposobnost keliranja željeza(II), uz ostvarene EC_{50} vrijednosti $34,17 \mu\text{g/mL}$ i $65,30 \mu\text{g/mL}$.

Citotoksični učinak fenolnih kiselina ($31,25$ - $4000 \mu\text{M}$) ispitan je na HepG2 i THP-1 staničnim kulturama primjenom MTS testa. Hidroksibenzojeve kiseline nisu značajno smanjile vijabilnost stanica, osim $500 \mu\text{M}$ galne (preživljenje HepG2 $38,95\%$) i $4000 \mu\text{M}$ izovanilinske kiseline (preživljenje THP-1 $38,06\%$). Među testiranim hidroksicimetnim kiselinama, citotoksično djelovanje pokazala je $4000 \mu\text{M}$ *o*-kumarinska kiselina (preživljenje HepG2 $58,70\%$) te $4000 \mu\text{M}$ ferulična, *o*- i *p*-kumarinska (preživljenje THP-1 $45,20$ - $49,00\%$).

Protuupalni učinak fenolnih kiselina u *in vitro* uvjetima testiran je određivanjem inhibicije IL-6 na splenocitima Balb/C miševa primjenom ELISA metode. Galna kiselina uzrokovala je 100% -tnu inhibiciju produkcije IL-6 pri svim testiranim koncentracijama (125 - $2000 \mu\text{M}$), dok su siringična i izovanilinska kiselina ostvarile IC_{50} vrijednost pri koncentraciji $2000 \mu\text{M}$. Od hidroksicimetnih kiselina snažnu inhibiciju pokazale su sve testirane koncentracije ružmarinske, klorogenske, kavene i sinapinske (125 - $2000 \mu\text{M}$).

Antigenotoksični učinak fenolnih kiselina dokazan je komet testom na uzorku humane krvi nakon tretiranja mikotoksinom bovericinom. Sve su testirane hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline smanjile duljinu repa za 48,19-60,60%. Repni intenziteti u stanicama tretiranim fenolnim kiselinama iznosili su 0,03-1,71%, što je značajno manje u odnosu na one tretirane bovericinom (7,90%). Vrijednosti repnog momenta (0,0029-0,209) također su bile značajno niže u usporedbi s bovericinom (1,480).

Biološki učinci odabranih vrsta roda *Micromeria*

Antioksidacijski učinak etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* ispitan je primjenom odgovarajućih spektrofotometrijskih metoda, u usporedbi s glavnim bioaktivnim sastavnicama i referentnim antioksidansima. Biljnim ekstraktima ustanovljena je sposobnost hvatanja DPPH slobodnih radikala ($EC_{50} = 4,60-8,33 \mu\text{g/mL}$) usporediva s BHT-om ($6,45 \mu\text{g/mL}$). Dobiveni rezultati za biljne uzorke pokazali su i njihovu dobru sposobnost redukcije ($EC_{50} = 9,64-17,4 \mu\text{g/mL}$). Vrijednosti antioksidativnog kapaciteta etanolnih ekstrakata ($265,76-470,03 \text{ mg EAK/g}$) bili su nešto niži u odnosu na referentni antioksidans (BHT, 694 mg EAK/g). Ispitivane biljne vrste također su pokazale i sposobnost keliranja Fe(II) ostvarujući EC_{50} vrijednosti $227,47-336,33 \mu\text{g/mL}$. Vrsta *M. croatica* pokazala je najbolja antioksidacijska svojstva, što se može pripisati visokim udjelima polifenola.

Citotoksični učinak etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* ispitan je na HepG2 i THP-1 staničnim kulturama primjenom MTS testa. U primijenjenim koncentracijama ($4,6-600 \mu\text{g/mL}$) nije dokazano citotoksično djelovanje ekstrakata.

Protuupalni učinak etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* ($18,75-300 \mu\text{g/mL}$) u *in vitro* uvjetima testiran je određivanjem inhibicije IL-6 na splenocitima Balb/C miševa primjenom ELISA metode. U najvećoj testiranoj koncentraciji sva tri ekstrakta uzrokovala su 100%-tnu inhibiciju produkcije IL-6, a njihov učinak smanjivao se u ovisnosti o koncentraciji.

Antigenotoksični učinak etanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* u koncentraciji $100 \mu\text{g/mL}$ ispitan je komet testom na uzorku humane krvi nakon tretiranja mikotoksinom bovericinom. Tretiranje stanica sa sva tri ekstrakta dovelo je do smanjenja duljine repa za

60,69% (*M. croatica*) do 48,53% (*M. thymifolia*). Sličan učinak potvrđen je i mjerenjem repnog intenziteta, gdje je *M. croatica* u potpunosti smanjila učinak bovericina. Repni moment za vrstu *M. croatica* bio je 0, dok je za ostale dvije vrste iznosio približno 0,07, što je višestruko manje od učinka bovericina (1,48)

Fitokemijska istraživanja provedena u ovom radu istaknula su vrste roda *Micromeria* kao bogate izvore polifenola, među kojima se posebice ističu fenolne kiseline. Biološka istraživanja ukazala su na veliki biomedicinski potencijal odabranih vrsta roda *Micromeria*. Izražena antioksidacijska, protuupalna i antigenotoksična svojstva ovih vrsta mogu se pripisati sadržaju ružmarinske i klorogenske kiseline. Usporednim istraživanjem prirodnih fenolnih kiselina dokazano je da djeluju antioksidacijski, protuupalno i antigenotoksično te da predstavljaju skupinu strukturno zanimljivih malih molekula koje mogu postati vodeći spojevi u istraživanju novih lijekova.

6 L I T E R A T U R A



- Abedini A, Roumy V, Mahieux S, Biabiany M, Standaert-Vitse A, Rivière C, Sahpaz S, Bailleul F, Neut C, Hennebelle T. Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evid Based Complement Alternat Med* (2013) 2013: 1-11
- Abu-Gharbieh E, Shehab NG, Kha SA. Anti-inflammatory and gastroprotective activities of the aqueous extract of *Micromeria fruticosa* (L.) Druce ssp. *serpyllifolia* in mice. *Pak J Med Sci* (2013) 26: 799-803
- Adefegha SA, Oboh G, Ejakpovi II, Oyeleye SI. Antioxidant and antidiabetic effects of gallic and protocatechuic acids: a structure–function perspective. *Comp Clin Pathol* (2015) - u tisku
- Ali-Shtayeh MS, Al-Nuri MA, Yaghmour RMR, Faidi YR. Antimicrobial activity of *Micromeria nervosa* from the Palestinian area. *J Ethnopharmacol* (1997) 58: 143-147
- Andjelković M, Van Camp J, De Meulenaer B, Depaemelaere G, Socaciu C, Verloo M, Verhe R. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem* (2006) 98: 23-31
- Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjić D. *Imunologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
- Arceusz A, Wesolowski M, Konieczynski P. Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review. *Nat Prod Commun* (2013) 8: 1821-1829
- Augustyniak A, Bartosz G, Čipak A, Duburs G, Horáková L, Łuczaj W, Majekova M, Odysseos AD, Rackova L, Skrzydlewska E, Stefek M, Štrosová M, Tirzitis G, Venskutonis PR, Viskupicova J, Vranka PS, Žarković N. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free Rad Res* (2010) 44: 1216-1262
- Bagdas D, Ozboluk HY, Cinkilic N, Gurun MS. Antinociceptive effect of chlorogenic acid in rats with painful diabetic neuropathy. *J Med Food* (2014) 17: 730-732
- Balaji C, Muthukumaran J, Nalini N. Chemopreventive effect of sinapic acid on 1,2-dimethylhydrazine-induced experimental rat colon carcinogenesis. *Hum Exp Toxicol* (2014) 33: 1253-1268
- Bellino A, Venturella P, Marceno C. Naringenin and neopocirin from *Micromeria* species and *Calamintha nepeta*. *Fitoterapia* (1980) 51: 163-165

- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* (1958) 181: 1199-1200
- Bräuchler C, Ryding O, Heubl G. The genus *Micromeria* (Lamiaceae), a synoptical update. *Willdenowia* (2008) 38: 363-410
- Brito A, Ramirez JA, Areche C, Sepúlveda B, Simirgiotis MJ. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in northern Chile. *Molecules* (2014) 19: 17400-17421
- Bunel V, Antoine MH, Nortier J, Duez P, Stévigny C. Nephroprotective effects of ferulic acid, Z-ligustilide and E-ligustilide isolated from *Angelica sinensis* against cisplatin toxicity *in vitro*. *Toxicol in Vitro* (2015) 29: 458-467
- Campanero MA, Escolar M, Perez G, Garcia-Quetglas E, Sadaba B, Azanza JR. Simultaneous determination of diosmin and diosmetin in human plasma by ion trap liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal* (2010) 51: 875-881
- Cha JW, Piao MJ, Kim KC, Yao CW, Zheng J, Kim SM, Hyun CL, Ahn YS, Hyun JW. The polyphenol chlorogenic acid attenuates UVB-mediated oxidative stress in human HaCaT keratinocytes. *Biomol Ther* (2014) 22: 136-142
- Chakraborty A, Ferk F, Simić T, Brantner A, Dusinská M, Kundi M, Hoelzl C, Nersesyan A, Knasmüller S. DNA-protective effects of sumach (*Rhus coriaria L.*), a common spice: results of human and animal studies. *Mutat Res* (2009) 661: 10-7
- Chen HJ, Inbaraj BS, Chen BH. Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. *Int J Mol Sci* (2012) 13: 260-285
- Chen WP, Wu LD. Chlorogenic acid suppresses interleukin-1 β -induced inflammatory mediators in human chondrocytes. *Int J Clin Exp Pathol* (2014) 7: 8797-8801
- Cho JY, Yang X, Park KH, Park HJ, Park SY, Moon JH, and Ham KS. Isolation and identification of antioxidative compounds and their activities from *Suaeda japonica*. *Food Sci Biotechnol* (2013) 22: 1547-1557
- Christ B, Müller KH. Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. *Arch Pharm* (1960) 293: 1033-1042.

- Couladis M, Tzakou O, Verykokidou E, Harvala C. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytother Res* (2003) 17: 194-195
- Cuvelier ME, Richard H, Berset C. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Biosci Biotech Biochem* (1992) 56: 324-325
- Čulić S. Citokini i autoimunosne bolesti. *Paediatr Croat* (2005) 49: 148-161
- Dewic PM. Medicinal natural products A biosynthetic approach. 2. izd, West Sussex, Engleska: John Wuley & Sons Ltd; 2007. str. 121-132
- Dou J, Lee VSY, Tzen JTC, Lee MR. Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes. *J Agric Food Chem* (2007) 55: 7462-7468
- Duda-Chodak A, Markiewicz D, Pierzchalski P. The effect of quercetin, chlorogenic acid and epigallocatechin on proliferation of Caco-2 cells. *Acta Sci Polon Technol Alim* (2009) 9: 863-869
- Dulger B. Antibacterial activity of three endemic *Micromeria* species. *Asian J Chem* (2008) 20: 6518-6522
- EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care). European Pharmacopoeia, 4th Ed., Strasbourg: Council of Europe; 2004. str. a188, b1867, c676
- Erdem MG, Cinkilic N, Vatan O, Yilmaz D, Bagdas D, Bilaloglu R. Genotoxic and anti-genotoxic effects of vanillic acid against mitomycin C-induced genomic damage in human lymphocytes in vitro. *Asian Pac J Cancer Prev* (2012) 13: 4993-4998
- Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem* (2008) 110: 76-82
- Fallarini S, Miglio G, Paoletti T, Minassi A, Amoruso A, Bardelli C, Brunelleschi S, Lombardi G. Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in *in vitro* models of neuronal death. *Br J Pharmacol* (2009) 157: 1072-1084
- Fecka I, Turek S. Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet majoram by chromatographic techniques. *Food Chem* (2008) 108: 1039-1053

- Ferk F, Chakraborty A, Jäger W, Kundi M, Bichler J, Mišić M, Wagner KH, Grasl-Kraupp B, Sagmeister S, Haidinger G, Hoelzl C, Nersesyan A, Dušinská M, Simić T, Knasmüller S. Potent protection of gallic acid against DNA oxidation: results of human and animal experiments. *Mutat Res* (2011) 715: 61-71
- Ferrer E, Juan-García A, Font G, Ruiz MJ. Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicol in Vitro* (2009) 23: 1504-1509
- Flohé L, Brigelius-Flohé R, Saliou C, Traber MG, Packer L. Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radical Biol Med* (1997) 22: 1115-1126
- Forenbacher S. Velebit i njegov biljni svijet. Zagreb: Školska knjiga; 2001. str. 587-588
- Formisano C, Oliviero F, Rigano D, Saab AM, Senatore F. Chemical composition of essential oils and in vitro antioxidant properties of extracts and essential oils of *Calamintha organifolia* and *Micromeria myrtifolia*, two Lamiaceae from the Lebanon flora. *Ind Crop Prod* (2014) 62: 405-411
- Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspec Med* (2010) 31: 435-445
- Fuentes E, Caballero J, Alarcon M, Rojas A, Palomo I. Chlorogenic acid inhibits human platelet activation and thrombus formation. *PLOS One* (2014) 9: 1-13
- Furtado RA, de Araújo FR, Resende FA, Cunha WR, Tavares DC. Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. *J Appl Toxicol* (2010) 30: 254-259
- Furtado RA, Oliveira BR, Silva LR, Cleto SS, Munari CC, Cunha WR, Tavares, DC. Chemopreventive effects of rosmarinic acid on rat colon carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev* (2015) 24: 106-112
- Gan SL, Zhou JW, Sun H. Clinical observation of caffeic acid for the treatment of leukopenia and thrombocytopenia induced by imatinib in patients with chronic myeloid leukemia. *J Leuk Lymphoma* (2013) 22: 105-106
- Gandhi NM, Nair CK. Protection of DNA and membrane from gamma radiation induced damage by gallic acid. *Mol Cell Biochem* (2005) 278: 111-117
- Gardana C, Scaglianti M, Pietta P, Simonetti P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* (2007) 45: 390-399

- Ghanem N, El Hamaouia B, El-Achib N, Bakkoura Y, Alwanc S, Houmaisia F, El-Nakatb JH, El-Omara F. Identification of nonvolatile phenolic acids and flavonoids with antioxidant activity in *Micromeria barbata* extract by RF-HPLC. *Int J Pharm Chem* (2014) 12: 142-145
- Grdinić V, Vuković J. Prevalidation in pharmaceutical analysis Part I. Fundamentals and critical discussion. *J Pharm Biomedl Anal* (2004) 35: 489-512
- Güven M, Aras AB, Akman T, Sen MH, Ozkan A, Sali O, Sehitoglu I, Kalkan Y, Silan C, Deniz M, Cosar M. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in rat model of embolic cerebral ischemia. *Iran J Basic Med Sci* (2015) 18: 356-363
- Gülçin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* (2006) 217: 213-220
- Güllüce M, Sökmen M, Şahin F, Sökmen A, Adigüzel A, Özer H. Biological activities of the essential oil and methanolic extract of *Micromeria fruticosa* (L) Druce ssp *serpyllifolia* (Bieb) PH Davis plants from the eastern Anatolia region of Turkey. *J Sci Food Agr* (2004) 84: 735-741
- Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. *Am J Pathol* (2009) 175: 2557-2565.
- Hossain MB, Rai DK, Brunton NP, Martin-Diana AB, Barry-Ryan C. Characterization of phenolics composition in lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *J Agric Food Chem* (2010) 58: 10576-1058
- Jaganathan SK. Growth inhibition by caffeic acid, one of the phenolic constituents of honey, in HCT 15 colon cancer cells. *Sci World J* (2012) 2012: 1-12
- Jang AH, Kim TH, Kim GD, Kim JE, Kim HJ, Kim SS, Jin YH, Park YS, Park CS. Rosmarinic acid attenuates 2,4-dinitrofluorobenzene induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Int Immunopharmacol* (2011) 11: 1271-1277
- Janicsák G, Máthé I, Miklóssy-Vári V, Blunden V. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. *Biochem Syst Ecol* (1999) 27: 733-738
- Jestoi M. Emerging Fusarium - mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin-a review. *Crit Rev Food Sci and Nutr* (2008) 48: 21-49

- Kalođera Z, Pepeljnjak S, Vladimir S. Antibacterial and antifungal activity of *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, Pharmazie (1993) 48: 311-313
- Kalođera Z, Vladimir S. *Micromeria* vrste u flori hrvatske. Farm glas (1992) 7-8: 203-214
- Kee HJ, Cho SN, Kim GR, Choi SY, Ryu Y, Kim IK, Hong YJ, Park HW, Ahn Y, Cho JG, Park JC, Jeong MH. Gallic acid inhibits vascular calcification through the blockade of BMP2–Smad1/5/8 signaling pathway. Vascu Pharmacol (2014) 63: 71-78
- Kiliç I, Yeşiloğlu Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc (2013) 115: 719-724
- Kim AR, Jin Q, Jin HG, Ko HJ, Woo ER. Phenolic compounds with IL-6 inhibitory activity from *Aster yomena*. Arch Pharm Res (2014) 37: 845-851
- Kim MC, Kim SJ, Kim DS, Jeon YD, Park SJ, Lee HS, Um JY Hong SH. Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by suppressing NF-κB in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. Immunopharm and Immunotoxicol (2011) 33: 525-532
- Kim SJ, Kim MC, Um JY, Hong SH. The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. Molecules (2010) 15: 7208-7217
- Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. Int Immunol (2010) 22: 347-352.
- Kopjar N, Garaj Vrhovac V, Milas I. Assesment of chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. Teratogen, Carcin and Mut (2002) 22: 13-30
- Kopjar N, Želježić D, Kašuba V, Rozgaj R. Antineoplastični lijekovi kao čindbenik rizika u radnom okolišu: mehanizmi djelovanja na razini stanice i pregled metoda za otkrivanje njihovih genotoksičnih učinaka. Arh Hig Rada Toksikol (2010) 61: 121-146
- Kuštrak D. Farmakognozija - Fitofarmacija. Zagreb: Golden marketing - Tehnička knjiga; 2005. str. 226-228; 289-294
- Lafay S, Gil-Izquierdo A. Bioavailability of phenolic acids. Phytochem Rev (2008) 7: 301-311
- Lee DH, Kim HH, Cho HJ, Bae JS, Yu YB, Park HJ. Antiplatelet effects of caffeic acid due to Ca^{2+} mobilization-inhibition via cAMP-dependent inositol-1,4,5-trisphosphate receptor phosphorylation. J Atheroscler Thromb (2014) 21: 23-37

- Li QY, Zhu YF, Zhang M, Chen L, Zhang Z, Du YL, Ren GQ, Tang JM, Zhong MK, **Shi XJ**. Chlorogenic acid inhibits hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cells proliferation via c-Src and Shc/Grb2/ERK2 signaling pathway. *Eur J Pharmacol* (2015) 751: 31-38
- Li X, Xiao H, Liang X, Shi D, Liu J. LC–MS/MS determination of naringin, hesperidin and neohesperidin in rat serum after orally administrating the decoction of *Bulpleurum falcatum* L. and *Fractus aurantii*. *J Pharm Biomed Anal* (2004) 34: 159-166
- Liu AH, Guo H, Ye M, Lin YH, Sun JH, Xu M, Guo DA. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* (2007) 1161: 170-182
- Liu IM, Hsu FL, Chen CF, Cheng JT. Antihyperglycemic action of isoferulic acid in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* (2000) 129: 631-636
- Liu QH, Woo ER. Inhibitory activity of IL-6 production by flavonoids and phenolic compounds from *Geranium thunbergii*. *Nat Prod Sci* (2008) 14: 16-20
- Luís Â, Silva F, Sousb S, Duarte AP, Domingues F. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling* (2014) 30: 69-79
- Ma Y, Gao M, Lio D. Chlorogenic acid improves high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Pharm Res* (2015) 32: 1200-1209
- de Magalhães PM, Dupont I, Hendrickx A, Joly A, Raas T, Dessy S, Sergent T, Schneider YJ. Anti-inflammatory effect and modulation of cytochrome P450 activities by *Artemisia annua* tea infusions in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chem* (2012) 134: 864-871
- Mainzen Prince PS, Roy AJ. *p*-Coumaric acid attenuates apoptosis in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats by inhibiting oxidative stress. *Int J Cardiol* (2013) 168: 3259-3266.
- Mallebrera B, Font G, Ruiz MJ. Disturbance of antioxidant capacity produced by beauvericin in CHO-K1 cells. *Toxicol Lett* (2014) 226: 337-342
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, and Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* (2005) 81(suppl): 230S-242S

- Marin PD, Grayer RJ, Veitch NC, Kite GC, Harborne JB. Acacetin glycosides as taxonomic markers in *Calamintha* and *Micromeria*. *Phytochemistry* (2001) 58: 943-947
- Marinova EM, Toneva A, Yanishlieva N. Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. *Food Chem* (2009) 114: 1498-1502
- Monagas M, Khan N, Andrés-Lacueva K, Urpí-Sarda M, Vézquez-Agell M, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Nutr* (2009) 102: 201-206
- Mosmann J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* (1983) 65: 55-63
- Mudnić I, Modun D, Rastija V, Vuković J, Brizić I, Katalinić V, Kozina B, Medić-Sarić M, Boban M. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chem* (2010) 119: 1205-1210
- Mueller M, Hobiger S, Jungbauer A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chem* (2010) 122: 987-996
- Muthukumaran J, Srinivasan S, Venkatesan RS, Ramachandran V, Muruganathan U. Syringic acid, a novel natural phenolic acid, normalizes hyperglycemia with special reference to glycoprotein components in experimental diabetic rats. *J Acut Dis* (2013) 2: 304-309
- Nićiforović N, Abramović H. Sinapic acid and its derivatives: natural sources and bioactivity. *Compr Rev Food Sci F* (2014) 13: 34-51
- Onakpoya IJ, Spencer EA, Thompson MJ, Heneghan CJ. The effect of chlorogenic acid on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Hum Hyper* (2015) 29: 77-81
- Öztürk M, Kolak U, Topçu G, Öksüz S, Choudhary MI. Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation. *Food Chem* (2011) 126: 31-38
- Panovska TK, Kulevanova S. Evaluation of antioxidant capacity of *Micromeria cristata* L. extracts. *Elect J Env Agricult Food Chem* (2010) 9: 627-635
- Paolini A, Curti V, Pasi F, Mazzini G, Nano R, Capelli E. Gallic acid exerts a protective or an anti-proliferative effect on glioma T98G cells via dose-dependent epigenetic regulation mediated by miRNAs. *In J Oncol* (2015) 46: 1491-1497

- Park DH, Park SJ, Kim JM, Jung WY, Ryu JH. Subchronic administration of rosmarinic acid, a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, enhances cognitive performances. *Fitoterapia* (2010) 81: 644-648
- Peng CC, Chyau CC, Wang HE, Chang CH, Chen KC, Chou KY, Peng RY. Cytotoxicity of ferulic acid on T24 cell line differentiated by different microenvironments. *Biomed Res Interl* (2013) 2013: 1-7
- Pérez-Fons L, Garzón MT, Micol V. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *J Agric Food Chem* (2010) 58: 161-171
- Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G. Mechanisms of DNA double strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* (2000) 15: 289-302.
- Prasad NR, Jeyanthimala K, Ramachandran S. Caffeic acid modulates ultraviolet radiation-B induced oxidative damage in human blood lymphocytes. *J Photochem Photobiol B* (2009) 95: 196-203
- Prasad NR, Karthikeyan A, Karthikeyan S, Reddy BV. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Mol Cell Biochem* (2011) 349: 11-19
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* (1999) 269: 337-341
- Prosperini A, Juan-García A, Font G, Ruiz MJ. Beauvericin-induced cytotoxicity via ROS production and mitochondrial damage in Caco-2 cells. *Toxicol Lett* (2013) 222: 204-211
- Qu J, Wang Y, Luo G, Wu Z. Identification and determination of glucuronides and their aglycone in *Erigeron breviscapus* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* (2001) 928: 155–162
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* (1996) 20: 933-956
- Robbins RJ. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology *J Agric Food Chem* (2003) 51: 2866-2887

- Sánchez-Rabaneda F, Jáuregui O, Lamuela-Raventós RM, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Identification of phenolic compounds in artichoke waste by highperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* (2003) 1008: 57-72
- Scheepens A, Bisson JF, Skinner M. p-Coumaric acid activates the GABA-A receptor *in vitro* and is orally anxiolytic *in vivo*. *Phytot Res* (2014) 28: 207-211
- Schneider G. Zur Bestimmung der Gerbstoffe mit Casein. *Arch Pharm* (1976) 309: 38-44.
- Senawong T, Misuna S, Khaopha S, Nuchadomrong S, Sawatsitang P, Phaosiri C, Surapaitoon A, Sripa B. Histone deacetylase (HDAC) inhibitory and antiproliferative activities of phenolic-rich extracts derived from the rhizome of *Hydnophytum formicarum* Jack.: sinapinic acid acts as HDAC inhibitor. *BMC Complement Altern Med* (2013) 13: 1-11
- Sergent T, Piront N, Meurice J, Toussaint O, Schneider YJ. Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium. *Chem Biol Interact* (2010) 188: 659-667
- Sevgi K, Tepe B, Sarikurkcü C. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem Toxicol* (2015) 77: 12-21
- Shailasree S, Venkataramana M, Niranjana SR, Prakash HS. Cytotoxic effect of p-Coumaric acid on neuroblastoma, N2a cell via generation of reactive oxygen species leading to dysfunction of mitochondria inducing apoptosis and autophagy. *Mol Neurobiol* (2015) 51: 119-130
- Shehab NG, Abu-Gharbieh E. Constituents and biological activity of the essential oil and the aqueous extract of *Micromeria fruticosa* (L.) Druce subsp. *Serpyllifolia*. *Pak J Pharm Sci* (2012) 25: 687-692
- Silambarasan T, Manivannan J, Priya MK, Suganya N, Chatterjee S, Raja B. Sinapic acid prevents hypertension and cardiovascular remodeling in pharmacological model of nitric oxide inhibited rats. *PLoS ONE* (2014) 9: 1-20
- Silva JP, Gomes AC, Coutinho OP. Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *Eur J Pharmacol* (2008) 601: 50-60
- Singh R, Trivedi P, Bawankule DU, Ahmad A, Shanker K. HILIC quantification of Oenotheralanosterol A and B from *Oenothera biennis* and their suppression of IL-6 and TNF- α expression in mouse macrophages. *J Ethnopharmacol* (2012) 141: 357-362

- Skaltsa H, Couladis M, Tzakou O, Harvala C. Flavonoids from *Satureja juliana*. *Fitoterapia* (1994) 65: 1-93
- Stanić G, Kalodera Z, Petričić J, Šugar I. Fitokemijsko ispitivanje vrste *Micromeria croatica* (Pers.) Schott. *Farm glas* (1988) 12: 407-412
- Sudheer AR, Muthukumaran S, Devipriya N, Devaraj H, Menon VP. Influence of ferulic acid on nicotine-induced lipid peroxidation, DNA damage and inflammation in experimental rats as compared to N-acetylcysteine. *Toxicology* (2008) 243: 317-29
- Šegvić Klarić M, Daraboš D, Rozgaj R, Kašuba V, Pepeljnjak S: Beauvericin and ochratoxin A genotoxicity evaluated using the alkaline comet assay: single and combined genotoxic action. *Arch Toxicol* (2010) 84: 641-650.
- Šegvić Klarić M, Pepeljnjak S, Domjan AM, Petrik J. Lipid peroxidation and glutathione levels in porcine kidney PK15 cells after individual and combined treatment with fumonisin B1, beauvericin and ochratoxin A. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* (2006) 100: 157-164
- Šilić Č. Endemične biljke. Sarajevo, Svjetlost; 1984. str.113
- Šilić Č. Monografija rodova *Satureja* L., *Calamintha* Miller, *Micromeria* Benth, *Acinos* Miller i *Clinopodium* L. u flori Jugoslavije. Sarajevo: Zemaljski muzej Bosne i hercegovine; 1979. str.172
- Štefan L, Tepšić T, Zaviđić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina* (2007) 43: 84-93
- Teixeira J, Gaspar A, Garrido EM, Garrido J, Borges F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *Biomed Res Int* (2013) 2013: 1-11
- Tepe B. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresour Technol* (2008) 6: 1584-1588
- Tokmak M, Yuksel Y, Sehitoglu MH, Guven M, Akman T, Aras AB, Cosar M, Abbed KM. The neuroprotective effect of syringic acid on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rats. *Inflammation* (2015) U tisku
- Tomas-Barberan FA, Gil MI, Marin PD, Tomas-Lorente, F. Flavonoids from some Yugoslavian *Micromeria* species: chemotaxonomical aspects. *Biochem Syst Ecol* (1991) 19: 697-698

- Tong L, Zhou D, Gao J, Zhu Y, Sun H, Bi K. Simultaneous determination of naringin, hesperidin, neohesperidin, naringenin and hesperetin of *Fractus aurantii* extract in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* (2012) 58: 58-64
- Tsimogiannis D, Samiotaki M, Panayotou G, Oreopoulou V. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules* (2007) 12: 593-606
- Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. *Diapensaceae to Mycosporaceae. Flora Europea, Volume 3*, Cambridge University Press; 1972. str. 171-172
- Utsunomiya H, Ichinose M, Ikeda K, Uozaki M, Morishita J, Kuwahara T, Koyama AH, Yamasaki H. Inhibition by caffeic acid of the influenza A virus multiplication in vitro *Int J Mol Med* (2014) 34: 1020-1024
- Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* (2007) 71: 230-235
- Villarino M, Sandín-España P, Melgarejo P, de Cal A. High chlorogenic and neochlorogenic acid levels in immature peaches reduce *Monilinia laxa* infection by interfering with fungal melanin biosynthesis. *J Agri Food Chem* (2011) 59: 3205-3213
- Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Kindl M, Vladić J, Lower-Nedza AD, Brantner AH. Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. *Molecules* (2014) 19: 767-782
- Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Babac M. Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. *Phytochemicals as nutraceuticals - global approaches to their role in nutrition and health*. Rijeka: InTech; 2011. str. 155-177
- Vladimir-Knežević S, Kalodera Z, Pepeljnjak S, Blažević N, Hazler K. Activity of essential oil and ethanolic extract isolated from *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch against dermatophytes. *Period Biol* (1994) 96: 383-385
- Vostálová J, Zdarilová A, Svobodová A. *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* (2010) 302: 171-181.
- Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*. 2. izd. Berlin-Heidelberg: Springer; 2009. str. 232,362

- Wang J, Lu DQ, Ling XQ, Wang JL, Qiao HQ, Ouyang PK. Simultaneous determination of four active components in tobacco wastes by LC. *Chromatographia* (2009) 59: 561-566
- Wang O, Liu J, Cheng Q, Guo X, Wang Y, Zhao L, Zhou F, Baoping J. Effects of ferulic acid and γ -oryzanol on high-fat and high-fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. *PLoS One* (2015) 10: 1-14
- Wang X, Li X, Chen D. Evaluation of antioxidant activity of isoferulic acid in vitro. *Nat Prod Commun* (2011) 6: 1285-1288.
- Weng SW, Hsu SC, Liu HC, Ji BC, Lien JC, Yu FS, Liu KC, Lai KC, Lin JP, Chung JG. Gallic acid induces DNA damage and inhibits DNA repair-associated protein expression in human oral cancer SCC-4 Cells. *Anticancer Res* (2015) 35: 2077-2084
- Xu Y, Jiang Z, Ji G, Liu J. Inhibition of bone metastasis from breast carcinoma by rosmarinic acid. *Planta Med* (2010) 76: 956-962
- Yan Y, Li J, Han J, Hou N, Song Y, Dong L. Chlorogenic acid enhances the effects of 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma cells through the inhibition of extracellular signal-regulated kinases. *Anti-Canc Drug* (2015) 25: 540-546
- Yao X, Huang J, Zhong H, Shenc N, Faggioni R, Fung M, Yao Y. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Therap* (2014) 141: 125-139
- Yesil-Celiktas O, Sevimli C, Bedir E, Vardar-Sukan F. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods Hum Nutr* (2010) 65: 158-163
- Zhang L, Wang H, Wang T, Jiang N, Yu P, Chong Y, Fu F. Ferulic acid ameliorates nerve injury induced by cerebral ischemia in rats. *Exp Ther Med* (2015) 9: 972-976
- Zhang M, Zhou J, Wang L, Li B, Guo J, Guan X, Han Q, Zhang H. Caffeic acid reduces cutaneous tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-6 and IL-1 β levels and ameliorates skin edema in acute and chronic model of cutaneous inflammation in mice. *Biol Pharm Bull* (2014)37: 347-354
- Zhang ZC, Xu M, Sun SF, Qiao X, Wang BR, Han J, Guo DA. Metabolic analysis of four phenolic acids in rat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromat B* (2008) 871: 7-14

Zhao Z, Moghadasian MH. Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies. *Phytochem Rev* (2010) 9:133-145

7 ŽIVOTOPIS



Maja Bival Štefan rođena je 02. 11. 1980. godine u Splitu. Osnovnu školu i II gimnaziju završila je u Zagrebu. Godine 1999. upisala je studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, a tijekom studiranja primala je stipendiju Sveučilišta u Zagrebu kao jedan od najboljih studenata na godini. Diplomirala je 2004. godine te se iste godine zaposlila kao znanstveni novak na Zavodu za analitičku kemiju Farmaceutsko biokemijskog fakulteta u Zagrebu. Od 2008. godine zaposlena je kao asistentica na Zavodu za farmakognoziiju. Sudjelovala je u izvođenju nastave iz kolegija Analitička kemija I i II te Odabrane metode instrumentalne analize na Zavodu za analitičku kemiju, a danas sudjeluje u izvođenju nastave kolegija Farmakognoziija I i II te Izolacija bioaktivnih prirodnih produkata na Zavodu za farmakognoziiju.

Na početku znanstvenog rada bila je suradnica na znanstveno-istraživačkom projektu Ministarstva znanosti obrazovanja i sporta voditelja prof.dr.sc. Nikole Kujundžića. Od 2008. godine znanstvena istraživanja provodi u sklopu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta voditeljice prof.dr.sc. Sande Vladimir-Knežević. Također je surađivala na dva projekta Sveučilišta u Zagrebu: Biološki učinci i fitokemijska karakterizacija ljekovitog bilja s primjenom u tradicionalnoj medicini (2013) i Istraživanje biomedicinskog potencijala sekundarnih biljnih metabolita (2014).

Tijekom 2010. godine usavršavala se u Austriji na Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Karl-Franzens-Universität Graz. Koautorica je 6 znanstvenih radova, od kojih je 5 indeksirano u bazi Current Contents, te je aktivno sudjelovala na domaćim i međunarodnim kongresima s 12 kongresnih priopćenja.

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u Current Contents bazi

Bival Štefan M, Vuković Rodríguez J, Blažeković B, Kindl M, Vladimir-Knežević S. Total hydroxycinnamic acids assay: Prevalidation and application on *Lamiaceae* species. Food Anal Meth (2014) 7: 326-336

Domitrović R, Škoda M, Vasiljev Marchesi V, Cvijanović, O, Pernjak Pugel E, Bival Štefan M. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. Food Chem Toxicol (2013) 51: 370-378

Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Alegro A, Kőszegi T, Petrik J. Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia. *Molecules* (2011) 16: 1454-1470

Blažeković B, Vladimir-Knežević S, Brantner, A Bival Štefan M. Evaluation of Antioxidant Potential of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. 'Budrovka': A comparative study with *L. angustifolia* Mill. *Molecules* (2010) 15: 5971-5987

Kujundžić N, Nigović B Bival M. Reaction of hydroxyurea with iron(III): Formation of mono- and bis(hydroxyureato)-iron(III) complexes. *Acta Chim Slov* (2008) 55: 632-636

Poglavlja u knjizi

Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Babac M. Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. *Phytochemicals as nutraceuticals - global approaches to their role in nutrition and health*. Rijeka : InTech; 2011. str. 155-177

8 TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTACION CARD



Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmakognoziiju
Marulićev trg 20, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

BIOLOŠKI UČINCI FENOLNIH KISELINA IZ ODABRANIH VRSTA PORODICE LAMIACEAE

Maja Bival Štefan

SAŽETAK

U okviru ovog doktorskog rada po prvi put je provedeno opsežno usporedno istraživanje bioloških učinaka 14 prirodnih fenolnih kiselina, prevalidacija metode određivanja ukupnih hidroksicimetnih derivata u biljnim drogama, fitokemijska karakterizacija fenolnih kiselina i flavonoida te biološki učinci odabranih vrsta roda *Micromeria* Benth (Lamiaceae). Antioksidacijski učinak fenolnih kiselina ispitan je primjenom četiri različite spektrofotometrijske metode. Hidroksicimetne kiseline su pokazale bolja antioksidacijska svojstva u odnosu na većinu hidroksibenzojevih kiselina, a iznimno dobar antioksidacijski učinak utvrđen je za ružmarinsku, kavenu i galnu kiselinu. Citotoksični učinak fenolnih kiselina ispitan je na HepG2 i THP 1 staničnim kulturama primjenom MTS testa, pri čemu većina testiranih kiselina nije pokazala značajnije smanjenje vijabilnosti stanica. Istraživanje protuupalnog djelovanja fenolnih kiselina istaknulo je galnu, ružmarinsku, klorogensku, kavenu i sinapinsku kiselinu kao dobre inhibitore interleukina-6. Komet testom na uzorku humane krvi nakon tretiranja bovericinom, dokazan je dobar antigenotoksični učinak svih ispitanih fenolnih kiselina. Fitokemijska analiza fenolnih kiselina i flavonoida u biljnim vrstama porodice Lamiaceae provedena je primjenom kromatografskih (HPTLC, RP-HPLC-DAD, LC-ESI-MS/MS) i spektrofotometrijskih metoda. U etanolnim ekstraktima vrsta *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia* identificirano je jedanaest fenolnih kiselina i petnaest flavonoida. Kriptoklorogenska, neoklorogenska, 3-*p*- i 4-*p*-kumaroilkin, 3-(3,4-dihidroksifenil)mliječna, salvianolna kiselina B i J te dimer i trimer ružmarinske kiseline po prvi put su identificirane u navedenim vrstama. Izuzev luteolinskih i akacetinskih derivata u vrstama *M. juliana* i *M. thymifolia*, ostali su flavonoidi također prvi put identificirani u ispitivanim vrstama roda *Micromeria*. Ustanovljena su dobra antioksidacijska, protuupalna i antigenotoksična svojstva odabranih biljnih vrsta, pri čemu se istaknula endemična vrsta *M. croatica*.

Dobiveni rezultati ukazali su na veliki biomedicinski potencijal ispitanih fenolnih kiselina i vrsta roda *Micromeria*.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 182 stranice, 47 slika, 43 tablica i 150 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: fenolne kiseline, flavonoidi, *Micromeria*, antioksidacijski učinak, citotoksični učinak, protuupalni učinak, IL-6, antigenotoksični učinak

Mentor: **Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević**, redoviti profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, izvanredni profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Dr. sc. Biljana Blažeković, docent, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Dr. sc. Donatella Verbanac, docent, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Rad prihvaćen: srpanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmacognosy
Marulićev trg 20, 10000 Zagreb, Croatia

PhD thesis

BIOLOGICAL EFFECTS OF PHENOLIC ACIDS FROM SELECTED LAMIACEAE SPECIES

Maja Bival Štefan

SUMMARY

A comprehensive comparative study of the biological effects of 14 natural phenolic acids, prevalidation of total hydroxycinnamic assays, identification of phenolic acids and flavonoids as well as biological activities of selected *Micromeria* species were conducted for the first time in this doctoral thesis.

Antioxidant activity of phenolic acids was tested using four different spectrophotometric methods. Hydroxycinnamic acids had better antioxidant properties than most hydroxybenzoic acids. Evaluation of antioxidant activity highlighted rosmarinic, caffeic and gallic acids as the best ones. Cytotoxic effect of phenolic acids was studied on HepG2 and THP-1 cell cultures using MTS test, and phenolic acids did not show significant reduction of cell viability. Investigation of phenolic acids' anti-inflammatory activity revealed gallic, rosmarinic, chlorogenic, caffeic and sinapinic acids as good inhibitors of interleukin-6 production. Comet assay on human blood cells treated with beavericin proved good antigenotoxic effects of all tested phenolic acids.

Phytochemical analysis of polyphenols was carried out using various chromatographic (HPTLC, RP-HPLC-DAD, LC-ESI-MS/MS) and spectrophotometric methods. Eleven phenolic acids and fifteen flavonoids were identified in the ethanolic extracts of *M. croatica*, *M. juliana* and *M. thymifolia*. Chryptochlorogenic, neochlorogenic, 3-*p*- and 4-*p*-coumaroylquinic, 3-(3,4- dihydroxyphenyl)lactic, salvianolic acid B and J as well as dimer and trimer of rosmarinic acid were identified in these species for the first time. With exception of luteolin and acacetin derivatives in *M. juliana* and *M. thymifolia*, flavonoids were identified for the first time in the tested species. Good antioxidant, anti-inflammatory and antigenotoxic properties were established for investigated *Micromeria* species with special emphasis on endemic *M. croatica*.

Obtained results revealed the great biomedical potential of tested phenolic acids and *Micromeria* species.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 182 pages, 47 figures, 43 tables and 150 references. Original is in Croatian language.

Keywords: phenolic acids, flavonoids, *Micromeria*, antioxidant effect, cytotoxic effect, anti-inflammatory effect, IL-6, antigenotoxic effect

Menthor: **Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D.** Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.

Reviewers: **Renata Jurišić Grubešić, Ph.D.** Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.

Biljana Blažeković, Ph.D. Assistant Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.

Donatella Verbanac, Ph.D. Assistant Professor, School of Medicine University of Zagreb

The thesis accepted: July, 2015